

УДК 612.017:616-092.18/.19+612.014.4:616-002.2:616-053.02+613.648.4+613.67

Л. М. Зварич✉, Д. А. Бази́ка

Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини, гематології та онкології Національної академії медичних наук України», вул. Юрія Ілленка, 53, м. Київ, 04050, Україна

## ДИЗРЕГУЛЯЦІЯ АУТОФАГІЇ У ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЯК ФАКТОР РОЗВИТКУ ІНФЛАМЕЙДЖИНГУ В ІМУНОСКОМПРОМЕТОВАНИХ ОСІБ НА ПРИКЛАДІ ВІЙСЬКОВОСЛУЖБОВЦІВ СИЛ ОБОРОНИ УКРАЇНИ ТА УЧАСНИКІВ ЛІКВІДАЦІЇ НАСЛІДКІВ АВАРІЇ НА ЧАЕС

**Мета:** оцінити функціональний стан та вікові особливості аутофагії у лейкоцитах периферичної крові, як фактору ризику розвитку інфламейджингу на прикладі військовослужбовців Сил оборони України та учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС.

**Матеріали і методи.** Обстежено 103 пацієнта чоловічої статі, віком 28–77 ( $56,48 \pm 9,05$ ) років. Серед них: основна група – 23 військовослужбовці Сил оборони України, віком 44–59 ( $50,21 \pm 5,13$ ) років; група порівняння – 57 учасників ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на ЧАЕС, віком 56–63 ( $60,31 \pm 1,78$ ) років і контрольна група – 23 цивільні особи, віком 28–77 ( $53,26 \pm 15,98$ ) років. Особи основної і контрольної групи були розподілені залежно від віку на підгрупи до 50 років і старше 50 років. Учасники ЛНА на ЧАЕС були поділені на 3 підгрупи залежно від дози опромінення: I –  $D < 100$  мЗв, II –  $100 < D < 500$  мЗв і III –  $D \geq 500$  мЗв. Аналіз показників аутофагії у лейкоцитах периферичної крові (ПК) проводили з використанням проточної цитометрії і полімеразної ланцюгової реакції.

**Результати.** У пацієнтів основної групи показники активності аутофагії (AAF) гранулоцитів та експресії гена *SQSTM1* у лейкоцитах ПК знижувалися. Виявлено зниження хлорохін-індукованого накопичення білка LC3B у лейкоцитах, AAF у моноцитах ПК та експресії генів *MTOR*, *RB1CC1* і *MAP1LC3B* у військовослужбовців Сил оборони України, молодше 50 років. Показники спонтанного рівня білка LC3B і AAF у моноцитах і рівень експресії генів *PIK3C3*, *ULK1* і *MAP1LC3B* у лейкоцитах ПК були підвищені у військовослужбовців Сил оборони України, старше 50 років. В учасників ЛНА на ЧАЕС різних дозових груп спостерігалось зниження показників AAF у лімфоцитах і гранулоцитах, рівня LC3B у моноцитах після інкубації з хлорохіном, експресії генів *MTOR*, *RB1CC1*, *SQSTM1*, *ULK1*, *MAP1LC3B*, *BECN1* і *PIK3C3* у лейкоцитах ПК, а показник AAF моноцитів був вищим. Виявлено схожі зміни показників хлорохін-індукованого накопичення LC3B у лімфоцитах і моноцитах учасників ЛНА на ЧАЕС та військовослужбовців обох вікових груп, а також спонтанного рівня білка LC3B у моноцитах ПК у учасників ЛНА на ЧАЕС, які були опромінені у дозах більше 100 мЗв і цивільних осіб, старше 50 років.

**Висновки.** Встановлена односпрямована дизрегуляція аутофагії у військовослужбовців Сил оборони України та учасників ЛНА на ЧАЕС. Наявні зміни показників аутофагії можуть призводити до порушення функціонування аутофагічного апарату лейкоцитів на рівні мРНК і білка, а також сигнальних шляхів, і бути пов'язаними з віковими змінами як на клітинному, так і організменному рівнях. Поява нових і персистенція більш ранніх стресорних чинників внаслідок війни створюють додаткове навантаження на механізми підтримки гомеостазу, що прослідковується в осіб, які зазнали дії іонізуючого випромінювання понад 30 років тому. Знайдені міжгрупові відмінності й подібності можуть активувати одній й ті самі чи подібні механізми патологічних процесів, що зрештою, підвищують ризики розвитку вік-асоційованої хронічної соматичної патології у молодших вікових групах.

**Ключові слова:** аутофагія; LC3B; лейкоцити; інфламейджинг; імунна система; стрес; військовослужбовці; війна; іонізуюче випромінювання; Чорнобиль; аварія на ЧАЕС.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2024. Вип. 29. С. 327–358. doi: 10.33145/2304-8336-2024-29-327-358

L. M. Zvarych✉, D. A. Bazyka

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine, Hematology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Yurii Illienka Str., Kyiv, 04050, Ukraine

## DYSREGULATION OF AUTOPHAGY IN PERIPHERAL BLOOD LEUCOCYTES IS A FACTOR IN THE DEVELOPMENT OF INFLAMMAGING IN IMMUNOCOMPROMISED PERSONS ON THE EXAMPLE OF THE SERVICEMEN OF THE DEFENSE FORCES OF UKRAINE AND CLEAN-UP WORKERS OF THE CHORNOBYL ACCIDENT

**Objective.** To assess the functional state and age-related characteristics of autophagy in peripheral blood leukocytes as a risk factor for the development of inflammaging using the example of the servicemen of the Defense Forces of Ukraine and clean-up workers of the Chornobyl accident.

**Materials and methods.** A total of 103 male patients aged 28–77 ( $56,48 \pm 9,05$ ) years were examined. They included: the main group – 23 servicemen of the Defense Forces of Ukraine aged 44–59 ( $50,21 \pm 5,13$ ) years; the comparison group – 57 clean-up workers of the Chornobyl accident aged 56–63 ( $60,31 \pm 1,78$ ) years; and the control group – 23 civilians aged 28–77 ( $53,26 \pm 15,98$ ) years. The individuals in the main and control groups were divided according to age into subgroups under 50 years and over 50 years. Clean-up workers were divided into 3 subgroups depending on the radiation dose: I –  $D < 100$  mSv, II –  $100 < D < 500$  mSv and III –  $D \geq 500$  mSv. Analysis of autophagy parameters in peripheral blood leukocytes (PB) was performed using flow cytometry and polymerase chain reaction.

**Results.** In patients of the main group, the autophagy activity factor (AAF) of granulocytes and the expression of the *SQSTM1* gene in PB leukocytes decreased. A decrease in chloroquine-induced accumulation of LC3B protein in leukocytes, AAF in PB monocytes and the expression of the *MTOR*, *RB1CC1* and *MAP1LC3B* genes was revealed in servicemen of the Defense Forces of Ukraine under 50 years of age. The spontaneous levels of LC3B protein and AAF in monocytes and the expression level of *PIK3C3*, *ULK1* and *MAP1LC3B* genes in PB leukocytes were increased in servicemen of the Defense Forces of Ukraine over 50 years of age. The clean-up workers of different dose groups showed a decrease in the AAF in lymphocytes and granulocytes, the LC3B level in monocytes after incubation with chloroquine, the expression of the *MTOR*, *RB1CC1*, *SQSTM1*, *ULK1*, *MAP1LC3B*, *BECN1* and *PIK3C3* genes in PB leukocytes, and the AAF of monocytes was higher. Similar changes were revealed in the indices of chloroquine-induced LC3B accumulation in lymphocytes and monocytes of the clean-up workers and servicemen of both age groups, as well as the spontaneous LC3B protein level in PB monocytes of the clean-up workers irradiated at doses above 100 mSv and civilians over 50 years old.

**Conclusions.** Unidirectional dysregulation of autophagy was established in the servicemen of the Defense Forces of Ukraine and the clean-up workers of the Chornobyl accident. The existing changes in autophagy parameters can lead to disruption of the functioning of the autophagic apparatus of leukocytes at the level of mRNA and protein, as well as signaling pathways, and be associated with age-related changes at both the cellular and organismal levels. The emergence of new and persistent earlier stress factors as a result of the war creates an additional load on the mechanisms of maintaining homeostasis, which is observed in individuals exposed to ionizing radiation more than 30 years later. The found intergroup differences and similarities can activate the same or similar mechanisms of pathological processes, which will ultimately increase the risks of developing age-associated chronic somatic pathology in younger age groups.

**Key words:** autophagy; LC3B; leukocytes; inflammaging; immune system; stress; servicemen; war; ionizing radiation; Chornobyl accident.

*Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2024;29:327–358. doi: 10.33145/2304-8336-2024-29-327-358*

### ВСТУП

Аутофагія – це еволюційно консервативний механізм, що контролює клітинний гомеостаз, сприяючи елімінації неправильно згорнутих білків і дисфункціональ-

### INTRODUCTION

Autophagy is an evolutionarily conserved mechanism that controls cellular homeostasis by promoting the elimination of misfolded proteins and dys-

✉ Liliia M. Zvarych, e-mail: l.zvarych@ukr.net

них органел, наприклад, мітохондрій та ендоплазматичного ретикулуму, за участі лізосомальної системи [1]. Стрес, дефіцит поживних речовин і пошкоджені органели активують у клітинах процес аутофагії [2]. Пригнічення аутофагії підвищує сприйнятливість до окисного пошкодження та апоптозу, тоді як активація аутофагії призводить до інгібування апоптозу. Хоча аутофагія відіграє захисну роль у відповідь на екзогенний стрес, тривала гіперактивація аутофагії також призводить до загибелі клітин, коли деградація цитозолу та органел є незворотною [3]. З віком активність аутофагії знижується, що призводить до накопичення клітинного дебрису, посилення оксидативного стресу і, як наслідок, до клітинного старіння та розвитку вік-асоційованих захворювань [2]. З'являється все більше доказів того, що аутофагія пов'язана з реакціями запалення, які активуються при багатьох патологічних станах [1]. Зниження активності аутофагії сприяє запаленню, у тому числі за допомогою прямої участі у формуванні прозапального стану. З одного боку, стимулюється оксидативний стрес шляхом накопичення пошкоджених мітохондрій, а з іншого — утворюються адипокіни, що відіграють важливу роль у запаленні. Розвивається системне запалення низького ступеня — інфламейджинг, що стає відправною точкою для наступних змін, пов'язаних з різними системними розладами [4]. Інфламейджинг є фактором ризику розвитку серцево-судинних захворювань, цукрового діабету, хронічної хвороби нирок, остеопорозу та неврологічних захворювань [5]. Патології, розвиток яких пов'язаний з підвищенням оксидативного стресу (серцево-судинні, хвороба Крона та ожиріння), пригнічують аутофагію, сприяючи прогресії захворювання [6]. Дизрегуляція аутофагії призводить до змін вродженої імунної відповіді, впливаючи на активність інфламасом, секрецію цитокінів, презентацію антигенів і функціонування лімфоцитів [7, 8], що стає підґрунтям зниження когнітивної функції, розвитку злоякісних новоутворень та аутоімунних реакцій у людей похилого віку [9]. Набутий старіючими клітинами секреторний фенотип, пов'язаний зі старінням (SASP), створює замкнену внутрішньоклітинну сигнальну петлю, що активує запальний каскад і забезпечує його підтримку [6]. Зрештою, складний набір генетичних, екологічних і вікових факторів, що взаємодіють між собою, відповідає за стійкість організму до інфламейджингу [2].

## МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Оцінити функціональний стан та вікові особливості аутофагії у лейкоцитах периферичної крові, як фактору ризику розвитку інфламейджингу на прикладі

functional organelles such as mitochondria and endoplasmic reticulum, with the participation of the lysosomal system [1]. Stress, nutrient deficiency, and damaged organelles activate the autophagic process in cells [2]. Inhibition of autophagy increases susceptibility to oxidative damage and apoptosis, whereas activation of autophagy leads to inhibition of apoptosis. Although autophagy plays a protective role in response to exogenous stress, long-term hyperactivation of autophagy also leads to cell death when cytosol and organelle degradation is irreversible [3]. With age, autophagic activity decreases, which leads to the accumulation of cellular debris, increased oxidative stress, and, as a consequence, cellular aging and the development of age-associated diseases [2]. There is growing evidence that autophagy is associated with inflammatory responses activated in many pathological conditions [1]. Decreased autophagy activity promotes inflammation, including through direct participation in the formation of a proinflammatory state. On the one hand, oxidative stress is stimulated by the accumulation of damaged mitochondria, and on the other hand, adipokines are formed, which play an important role in inflammation. Low-grade systemic inflammation, inflammaging, develop, becoming the starting point for subsequent changes associated with various systemic disorders [4]. Inflammaging is a risk factor for the development of cardiovascular diseases, diabetes mellitus, chronic kidney disease, osteoporosis, and neurological diseases [5]. Pathologies whose development is associated with increased oxidative stress (cardiovascular, Crohn's disease, and obesity) inhibit autophagy, contributing to disease progression [6]. Dysregulation of autophagy alters the innate immune response by affecting inflammasome activity, cytokine secretion, antigen presentation, and lymphocyte function [7, 8], which underlies cognitive decline, development of malignancy, and autoimmunity in elderly people [9]. The senescence-associated secretory phenotype (SASP) of the senescent cells creates a closed intracellular signaling loop that activates and maintains the inflammatory cascade [6]. Ultimately, a complex set of interacting genetic, environmental, and age-related factors is responsible for the body's resistance to inflammaging [2].

## OBJECTIVE

To assess the functional state and age-related characteristics of autophagy in peripheral blood leukocytes as a risk factor for the development of inflam-

військовослужбовців Сил оборони України та учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС.

**ПАЦІЄНТИ І МЕТОДИ**

До груп обстеження увійшли 103 особи чоловічої статі, віком 28–77 ( $56,48 \pm 9,05$ ) років. Основну групу імуноскомпрометованих осіб склали 23 військовослужбовці Сил оборони України, віком 44–59 ( $50,21 \pm 5,13$ ) років, а групу порівняння – 57 учасників ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на ЧАЕС, віком 56–63 ( $60,31 \pm 1,78$ ) років. Контрольна група (КГ) – 23 цивільні особи (вік 28–77 ( $53,26 \pm 15,98$ ) років), які не брали участі в ЛНА на ЧАЕС і не мешкали на радіоактивно забруднених територіях. Основну і контрольну групи було поділено на 2 підгрупи, залежно від віку: підгрупа 1 – військовослужбовці (В1) та цивільні (К1), до 50 років (вік < 50) і підгрупа 2 – військовослужбовці (В2) та цивільні (К2), старше 50 років (вік  $\geq 50$ ). Додатково учасників ЛНА на ЧАЕС було розподілено на 3 підгрупи, залежно від дози опромінення. В усіх обстежених осіб наявні захворювання соматичного характеру та відсутня онко- чи онкогематологічна патологія в анамнезі. Загальна характеристика груп обстеження наведена у табл. 1.

Основним біологічним маркером аутофагії є білок LC3B (microtubule associated protein 1 light chain 3 beta) [10]. Для визначення активності аутофагії за відносними рівнями LC3B у лейкоцитах периферичної крові (ПК) цільну кров розподіляли на дві 15-міліметрові пробірки. В одну пробірку додавали лише живильне середовище RPMI-1640 Medium з L-глутаміном та натрію

maging using the example of the servicemen of the Defense Forces of Ukraine and clean-up workers of the Chernobyl accident.

**PATIENTS AND METHODS**

The study groups included 103 males aged 28–77 ( $56.48 \pm 9.05$ ) years. The main group of immunocompromised individuals included 23 servicemen of the Defense Forces of Ukraine, aged 44–59 ( $50.21 \pm 5.13$ ) years, and the comparison group included 57 clean-up workers of the Chernobyl accident, aged 56–63 ( $60.31 \pm 1.78$ ) years. The control group (Control) included 23 civilians (aged 28–77 ( $53.26 \pm 15.98$ ) years) who did not participate in the liquidation of the consequences of the Chernobyl accident and did not live in radioactively contaminated areas. The main and control groups were divided into 2 subgroups depending on age: subgroup 1 – servicemen (B1) and civilians (K1), under 50 years old (age < 50) and subgroup 2 – servicemen (B2) and civilians (K2), over 50 years old (age  $\geq 50$ ). Additionally, the clean-up workers were divided into 3 subgroups depending on the radiation dose. All examined individuals have somatic diseases and no history of onco- or oncohematological pathology. The characteristics of the examination groups are given in Table 1.

The main biological marker of autophagy is the protein LC3B (microtubule associated protein 1 light chain 3 beta) [10]. To determine autophagy activity by relative LC3B levels in peripheral blood (PB) leukocytes, whole blood was divided into two 15 ml tubes. One tube contained only the RPMI-1640 Medium with L-glutamine and sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, USA) with 10 % fetal bovine serum (Sigma-

**Таблиця 1**  
**Характеристика груп обстеження**

**Table 1**  
**Characteristics of the studied groups**

Групи обстеження / Study group	Кількість (осіб) Number of patients, n	Вік, роки / Age, years M $\pm$ SD (min / max)	Доза, мЗв / Dose, mSv M $\pm$ SD (min / max)
Контрольна група / Control group	23	53,26 $\pm$ 15,98 (28 / 77)	–
підгрупа K1 / subgroup K1 (Вік / Age < 50)	10	37,50 $\pm$ 6,05 (28 / 45)	–
підгрупа K2 / subgroup K2 (Вік / Age $\geq 50$ )	13	65,38 $\pm$ 8,62 (51 / 77)	–
Основна група – військовослужбовці / Main group – servicemen	23	50,21 $\pm$ 5,13 (44 / 59)	–
підгрупа B1 / subgroup B1 (Вік < 50 / Age < 50)	13	46,46 $\pm$ 2,10 (44 / 49)	–
підгрупа B2 / subgroup B2 (Вік $\geq 50$ / Age $\geq 50$ )	10	55,10 $\pm$ 3,41 (50 / 59)	–
Учасники ЛНА на ЧАЕС / Clean-up workers	57	60,31 $\pm$ 1,78 (56 / 63)	243,50 $\pm$ 249,28 (1,2 / 990,0)
D < 100 мЗв / D < 100 mSv	20	60,20 $\pm$ 1,73 (56 / 63)	49,26 $\pm$ 31,47 (1,2 / 98,2)
100 < D < 500 мЗв / 100 < D < 500 mSv	29	60,41 $\pm$ 1,93 (56 / 63)	232,26 $\pm$ 70,44 (108,0 / 420,0)
D $\geq 500$ мЗв / D $\geq 500$ mSv	8	60,25 $\pm$ 1,48 (57 / 62)	770,07 $\pm$ 222,02 (500,0 / 990,0)



гідрокарбонатом (Sigma-Aldrich, США) з 10 % ембріональною телячою сироваткою (Sigma-Aldrich, США) та 1 % розчину антибіотику-антимікотику (Sigma-Aldrich, США). Оскільки білок LC3B має 2 форми – цитозольну LC3-I і асоційовану з аутофагосомами LC3-II, що деградує після утворення аутолізосоми, для визначення LC3B<sup>+</sup> аутофагосом, рекомендується використовувати інгібітор злиття аутофагосом з лізосомами. Тому в іншу пробірку, крім живильного середовища, додавали 50 μM розчин хлорохіну дифосфату (CAS Number: 50-63-5, Sigma-Aldrich, США) – реагент, що блокує процес злиття аутофагосом з лізосомами [10]. Зразки в обох пробірках інкубували протягом 2 годин у стандартних умовах в CO<sub>2</sub> інкубаторі при 5 % CO<sub>2</sub>, температурі 37 °C і 95 % вологості.

Рівні білка LC3B у лейкоцитах ПК після культивування визначали методом проточної цитометрії [10]. Для гейтування живих клітин без дублетів використовували моноклональне антитіло Anti-Active Caspase-3 FITC та флуоресцентні барвники BD Horizon™ Fixable Viability Stain 570 і DAPI (BD, США). Визначення рівнів білка LC3B проводили за допомогою непрямого імуофлуоресцентного забарвлення клітин з використанням кролячого поліклонального антитіла проти LC3B з набору LC3B Antibody Kit for Autophagy (Invitrogen, США) та вторинного антитіла з флуоресцентною міткою Alexa Fluor™ 647 (Invitrogen, США). Аналіз зразків ПК проводили на проточному цитометрі BD FACSLyric (BD, США) за допомогою програмного забезпечення BD FACSuite (BD, США) для 15 000 подій у режимах «Density plot» і «Dot histogram». Приклад гейтування LC3B<sup>+</sup> лімфоцитів наведено на рис. 1. Медіана інтенсивності флуоресценції (MFI) LC3B використовувалася для визначення базального рівня LC3B. Показник активності аутофагії (AAF) розраховували за формулою:

$$AAF = \frac{MFI LC3B CQ - MFI LC3B Spont}{MFI LC3BCQ} \times 100$$

де MFI LC3B CQ – показник MFI LC3B у лейкоцитах ПК, що інкубувалися з хлорохіном, а MFI LC3B Spont – без хлорохіну.

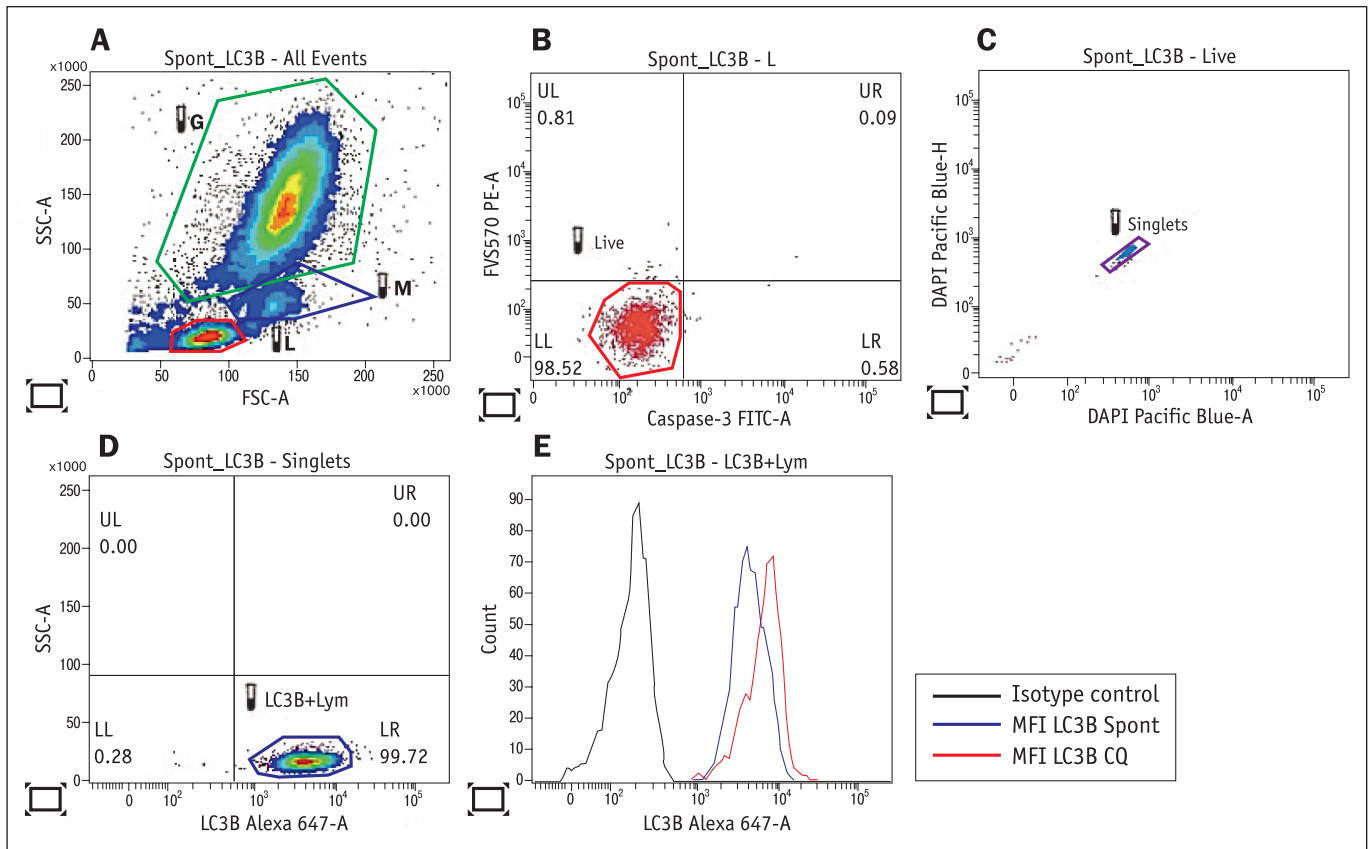
Визначення відносного рівня експресії генів, що кодують білки молекулярного комплексу аутофагії (табл. 2) у лейкоцитах ПК проводили за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Виділення загальної РНК проводили за допомогою автоматичної станції QIAcube (QIAGEN, Німеччина) з використанням набору NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel, Німеччина). Набір High

Aldrich, USA) and 1 % antibiotic-antimycotic solution (Sigma-Aldrich, USA). Since LC3B protein has 2 forms – cytosolic LC3-I and autophagosome-associated LC3-II, which degrades after the formation of an autolysosome, it is recommended to use an inhibitor of autophagosome-lysosome fusion to determine LC3B<sup>+</sup> autophagosomes. Therefore, in addition to the growth medium, a 50 μM solution of chloroquine diphosphate (CAS Number: 50-63-5, Sigma-Aldrich, USA) was added to another test tube – a reagent that blocks the process of autophagosome-lysosome fusion [10]. Samples in both tubes were incubated for 2 hours under standard conditions in a CO<sub>2</sub> incubator at 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C and 95 % humidity.

LC3B protein levels in PB leukocytes after cultivation were determined by flow cytometry [10]. Anti-Active Caspase-3 FITC monoclonal antibody and BD Horizon™ Fixable Viability Stain 570 and DAPI fluorescent dyes (BD, USA) were used for gating live cells without doublets. LC3B protein levels were determined by indirect immunofluorescent staining of cells using the rabbit polyclonal antibody against LC3B from the LC3B Antibody Kit for Autophagy (Invitrogen, USA) and the secondary antibody with the fluorescent label Alexa Fluor™ 647 (Invitrogen, USA). The analysis of PB samples was performed on a BD FACSLyric flow cytometer (BD, USA) using BD FACSuite software (BD, USA) for 15,000 events in the Density plot and Dot histogram modes. An example of gating of LC3B<sup>+</sup> lymphocytes is shown in Fig. 1. The median fluorescence intensity (MFI) of LC3B was used to determine the basal level of LC3B. The autophagy activity factor (AAF) was calculated using the formula:

where MFI LC3B CQ is the MFI LC3B parameters in PB leukocytes incubated with chloroquine, MFI LC3B Spont is without chloroquine.

Determination of the relative expression level of genes encoding proteins of the autophagy molecular complex (Table 2) in PB leukocytes was performed using the real-time polymerase chain reaction (PCR). Total RNA was isolated using the QIAcube automated station (QIAGEN, Germany) using the NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel, Germany). The High Capacity cDNA



**Рисунок 1.** Схема гейтування LC3B<sup>+</sup> лімфоцитів

Лімфоцити, моноцити і гранулоцити гейтуються на графіку «Density plot» SSC vs FSC: L – лімфоцити, M – моноцити, G – гранулоцити (A). Живі лімфоцити (Caspase-3<sup>-</sup> / FVS570<sup>-</sup>) гейтуються на графіку «Dot plot» Caspase-3-FITC vs FVS570-PE (B). Видалення дублетів на графіку «Dot plot» DAPI-A vs DAPI-H (C). Гейтування LC3B<sup>+</sup> лімфоцитів на графіку «Density plot» SSC vs LC3B-Alexa 647 (D) та накладання гістограм MFI ізотипного контролю, MFI LC3B Spont і MFI LC3B CQ лімфоцитів (E)

**Figure 1.** LC3B<sup>+</sup> lymphocytes gating scheme

Lymphocytes, monocytes, and granulocytes are gated on the SSC vs. FSC «Density plot»: L – lymphocytes, M – monocytes, G – granulocytes (A). Live lymphocytes (Caspase-3<sup>-</sup> / FVS570<sup>-</sup>) are gated on the Caspase-3-FITC vs. FVS570-PE «Dot plot» (B). Doublet removal on the DAPI-A vs. DAPI-H «Dot plot» (C). LC3B<sup>+</sup> lymphocytes gating on the SSC vs. LC3B-Alexa 647 «Density plot» (D) and histogram overlay of MFI isotype control, MFI LC3B Spont, and MFI LC3B CQ lymphocytes (E)

Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США) використовували для проведення реакції зворотної транскрипції для отримання кДНК зі зразків виділеної загальної РНК. Ампліфікацію проводили у 96-луночних плашках із сумішшю TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, США), праймерів TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, США) та кДНК з водою, очищеною від РНКаз, за допомогою ампліфікатора 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Assay ID праймерів TaqMan Gene Expression Assay обраних генів і характеристики білків, які вони кодують, наведено у табл. 2.

За ендогенний контроль було обрано еукаріотичну 18S рРНК (Applied Biosystems, США). Показники відносного рівня генної експресії (RQ – relative quantification, відносна кількісна оцінка) автоматично розраховувалися за допомогою 2<sup>-ΔΔCt</sup> методу

Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) was used for the reverse transcription reaction to obtain cDNA from the isolated total RNA samples. Amplification was performed in 96-well plates with TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA), TaqMan Gene Expression Assay primers (Applied Biosystems, USA) and cDNA with water purified from RNases, using the 7900 HT System amplifier (Applied Biosystems, USA). Assay IDs of the TaqMan Gene Expression Assay primers of the selected genes and the characteristics of the proteins they encode are listed in Table 2.

Eukaryotic 18S rRNA (Applied Biosystems, USA) was chosen as an endogenous control. Relative gene expression levels (RQ – relative quantification) were automatically calculated using the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method by the SDS 2.3 software

**Таблиця 2**

**Перелік генів та Assay ID праймерів TaqMan Gene Expression Assay**

**Table 2**

**List of genes and Assay ID of primers TaqMan Gene Expression Assay**

Назва гена Gene name	Assay ID	Функції білка / Protein functions
<b>MTOR</b>	Hs00234508_m1	Серин/треонінова кіназа, що є центральним регулятором аутофагії за рахунок фосфорилювання ULK1, що призводить до порушення взаємодії AMPK та ULK1, інгібуючи ініціацію аутофагії [11] The serine/threonine kinase is a central regulator of autophagy by phosphorylating ULK1, which disrupts the interaction of AMPK and ULK1, inhibiting the initiation of autophagy [11]
<b>PRKAA1</b>	Hs01562315_m1	Серин/треонінова протеїнкіназа AMPK є датчиком внутрішньоклітинного енергетичного статусу та сприяє активації аутофагії за рахунок фосфорилювання білків аутофагії або регулювання експресії транскрипційних факторів, пов'язаних з генами білків аутофагії [12] The serine/threonine protein kinase AMPK is a sensor of intracellular energy status and promotes the activation of autophagy by phosphorylating autophagy proteins or regulating the expression of transcription factors associated with autophagy protein genes [12]
<b>ULK1</b>	Hs00177504_m1	Серин/треонінова кіназа, що зв'язується з білками FIP200, ATG13 і ATG101 утворюючи комплекс ініціації ULK1-ATG13-FIP200 [13] The serine/threonine kinase that binds to FIP200, ATG13 and ATG101 proteins forming the ULK1-ATG13-FIP200 initiation complex [13]
<b>RB1CC1</b>	Hs01089002_m1	FIP200 – білок, що функціонує як компонент комплексу ініціації аутофагії ULK1-ATG13-FIP200 [14] FIP200 is a protein that functions as a component of the autophagy initiation complex ULK1-ATG13-FIP200 [14]
<b>BECN1</b>	Hs00186838_m1	Алостеричний модулятор комплексів фосфатиділінозитол 3-кінази (PI3KC3) класу III (PI3KC3-C1 і PI3KC3-C2), що генерують фосфатиділінозитол 3-фосфат (PI3P) у комплексі Beclin1-ATG14-VPS15-VPS34 для утворення пре-аутофagosомного фагофору в місці аутофагічного вантажу [15] / The allosteric modulator of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3KC3) class III complexes (PI3KC3-C1 and PI3KC3-C2), which generate phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) in the Beclin1-ATG14-VPS15-VPS34 complex to form the pre-autophagosomal phagophore at the site autophagic cargo [15]
<b>PIK3C3</b>	Hs00176908_m1	Каталітичний компонент PI3KC3-C1, що генерує PI3P у фагофор та стабілізує комплекс ULK [16] The catalytic component PI3KC3-C1, which generates PI3P in the phagophore and stabilizes the ULK complex [16]
<b>ATG5</b>	Hs00169468_m1	Частина комплексу ATG5-ATG12-ATG16L1, що сприяє кон'югації ATG4-розщепленого білка LC3-I з фосфатидилетанол-аміном (PE) з утворенням форми LC3-II, що є необхідним для формування та розширення двомембранних органел – аутофagosом [17] The part of the ATG5-ATG12-ATG16L1 complex, which contributes to the conjugation of the ATG4-cleaved LC3-I protein with Phosphatidylethanolamine (PE) to form LC3-II, which is necessary for the formation and expansion of double-membrane organelles – autophagosomes [17]
<b>MAP1LC3B</b>	Hs00917683_m1	Член родини убіквітиноподібних білків ATG8, кон'югований з PE, що відповідає за зв'язування аутофagosоми з кінезиновим двигуном на основі мікротрубочок, а також злиття аутофagosоми з лізосоною з утворенням аутолізосоми [16, 18] The PE-conjugated member of the ATG8 family of ubiquitin-like proteins responsible for the binding of the autophagosome to the microtubule-based kinesin motor and the fusion of the autophagosome with the lysosome to form the autolysosome [16, 18]
<b>SQSTM1</b>	Hs00177654_m1	Селективний рецептор аутофагії, що розпізнає і доставляє агрегований поліубіквітинований білковий вантаж до аутофagosоми, сприяючи деградації неправильно згорнутих білків [19] The selective autophagy receptor that recognizes and delivers aggregated polyubiquitinated protein cargo to autophagosomes, promoting the degradation of misfolded proteins [19]
<b>RAV7A</b>	Hs01115139_m1	Невеликий білок родини ГТФаз, що відповідає за регуляцію пізнього ендцитозу та контроль кінцевого етапу дозрівання аутофagosоми в аутолізосоми [17] The small protein of the GTPase family responsible for the regulation of late endocytosis and the control of the final stage of maturation of the autophagosome into the autolysosome [17]
<b>STX17</b>	Hs00215603_m1	Рекрутується на зовнішню мембрану зрілої аутофagosоми для взаємодії з цитозольним білком SNAP29 і лізосомальним VAMP8 для полегшення злиття аутофagosоми та лізосоми [20] The protein is recruited to the outer membrane of the mature autophagosome to interact with cytosolic protein SNAP29 and lysosomal VAMP8 to facilitate autophagosome-lysosome fusion

програмним забезпеченням SDS 2.3 (Applied Biosystems, США), аналіз проводили з використанням програми RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems, США).

(Applied Biosystems, USA), and the analysis was performed using the RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems, USA).

**Статистичний аналіз даних**

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica 8.0 (StatSoft. Inc.). Нормальність розподілу кількісних змінних визначали за допомогою тесту Колмогорова-Смірнова з поправкою Ліллієфорса. Для порівняння показників, що характеризувалися нормальним розподілом, застосували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) з апостеріорним тестом Тьюкі HSD для нерівних вибірок. Для показників, розподіл яких відрізнявся від нормального, використовували непараметричний ранговий аналіз варіацій за Краскелом-Уолісом і медіанний тест з попарним порівнянням середніх рангів для усіх груп. Зв'язок між параметрами розраховували за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона або Спірмена. Рівень статистичної значущості було встановлено на рівні  $p < 0,05$ , а  $0,06 \leq p \leq 0,10$  було прийнято як ознаку тенденції.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

За результатами дослідження не спостерігалось статистично значущих змін спонтанного (без хлорохіну) рівня білка LC3B у лімфоцитах і гранулоцитах ПК як військовослужбовців Сил оборони України, так і учасників ЛНА на ЧАЕС, порівняно з показниками осіб контрольної групи, незалежно від віку (табл. 3). Показники спонтанного рівня білка LC3B у моноцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС та осіб підгрупи K2 були подібними, але нижчими ( $p < 0,05$ ), ніж в осіб підгрупи K1. Зокрема зниження показників спонтанного рівня білка LC3B у моноцитах ПК спостерігалось в учасників ЛНА на ЧАЕС з  $100 < D < 500$  мЗв і  $D \geq 500$  мЗв ( $p < 0,05$ ).

**Таблиця 3**

**Спонтанний рівень білка LC3B у лейкоцитах ПК осіб груп обстеження, (M ± SD)**

**Table 3**

**The spontaneous level of LC3B protein in PB leukocytes of individuals in the study groups, (M ± SD)**

Групи обстеження / Study groups	MFI LC3B	MFI LC3B	MFI LC3B
	у лімфоцитах, у. о. lymphocytes, c.u.	у моноцитах, у. о. monocytes, c.u.	у гранулоцитах, у. о. granulocytes, c.u.
Контрольна група / Control group	3508,57 ± 1546,55	9978,36 ± 3561,84	10808,18 ± 3907,08
підгрупа K1 / subgroup K1 (вік / age < 50)	3522,20 ± 1452,27	11748,40 ± 4037,83	10880,67 ± 2471,47
підгрупа K2 / subgroup K2 (вік / age ≥ 50)	3498,08 ± 1674,19	8503,33 ± 2378,79*	10758,00 ± 4757,67
Основна група – військовослужбовці / Main group – servicemen	3915,30 ± 2521,18	10458,37 ± 5651,92	12258,73 ± 6237,27
підгрупа B1 / subgroup B1 (вік / age < 50)	3330,38 ± 2042,71	9378,64 ± 4683,76	12203,15 ± 6075,62
підгрупа B2 / subgroup B2 (вік / age ≥ 50)	4675,70 ± 2972,80	11943,00 ± 6815,55	12339,00 ± 6836,66
Учасники ЛНА на ЧАЕС / Clean-up workers	4108,91 ± 2854,09	8434,37 ± 3677,79*	10584,88 ± 5474,79
D < 100 мЗв / D < 100 mSv	3398,68 ± 1842,50	8780,26 ± 4208,29	10075,50 ± 4770,38
100 < D < 500 мЗв / 100 < D < 500 mSv	3973,37 ± 2211,41	8127,08 ± 2761,21*	10509,89 ± 4990,63
D ≥ 500 мЗв / D ≥ 500 mSv	3531,00 ± 1428,88	7089,33 ± 3869,16*	9614,57 ± 5287,33

Примітка. \* $p < 0,05$  порівняно з підгрупою K1 (вік < 50)

Note. \* $p < 0.05$  significant differences with the subgroup K1 (age < 50)

**Statistical data analysis**

Statistical analysis was performed using Statistica 8.0 software (StatSoft. Inc.). The normality of the distribution of quantitative variables was determined using the Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction. One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's HSD post hoc test for unequal samples was used to compare indicators that were characterized by a normal distribution. Non-parametric Kruskal-Wallis rank analysis of variations and median test with the pairwise comparison of average ranks for all groups were used for parameters whose distribution differed from the average. The relationship between parameters was calculated using the Pearson or Spearman correlation coefficient. The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ , and  $0.06 \leq p \leq 0.10$  was accepted as a sign of a trend.

**RESULTS**

The study results did not reveal any statistically significant changes in the spontaneous level of LC3B protein in PB lymphocytes and granulocytes of both the servicemen of the Defense Forces of Ukraine and the clean-up workers compared to the values in the control group, regardless of age (see Table 3). The spontaneous level of LC3B protein in PB monocytes of the clean-up workers and those in subgroup K2 were similar but lower ( $p < 0.05$ ) than in those in subgroup K1. In particular, a decrease in the spontaneous level of LC3B protein in PB monocytes was observed in the clean-up workers with the dose of  $100 < D < 500$  mSv and  $D \geq 500$  mSv



Показник спонтанного рівня білка LC3B у моноцитах ПК військовослужбовців підгрупи B2 демонстрував тенденцію до збільшення, порівняно з показником осіб підгрупи K2.

Оскільки білок LC3B має 2 форми – цитозольну LC3-I і асоційовану з аутофагосомами – LC3-II, що деградує після утворення аутолізосоми, для вимірювання рівнів білка LC3B, що знаходиться на аутофагосомах, до лейкоцитів ПК додавали інгібітор злиття аутофагосом з лізосомами – хлорохін дифосфат. Після додавання хлорохіну, рівень білка LC3B у лімфоцитах ПК об'єднаної групи військовослужбовців був нижчим ( $p < 0,05$ ), ніж в осіб контрольної групи (табл. 4). Незважаючи на те, що військовослужбовці підгрупи B1 були молодші, ніж учасники ЛНА на ЧАЕС, в осіб обох груп спостерігалася тенденція до зниження рівня білка LC3B на аутофагосомах у лімфоцитах ПК після інкубації з хлорохіном, порівняно з показником осіб підгрупи K1. Крім того дана тенденція зберігалася при порівнянні даного показника учасників ЛНА на ЧАЕС з особами підгрупи K2. Отримана тенденція в учасників ЛНА на ЧАЕС була обумовлена зниженням показника в осіб з  $D < 100$  мЗв ( $p < 0,05$ ) порівняно з особами обох підгруп контрольної групи (див. табл. 4).

Виявлено тенденцію до зниження рівня білка LC3B на аутофагосомах у моноцитах ПК військовослужбовців підгрупи B1 і осіб підгрупи K2, порівняно з показником осіб підгрупи K1 після інкубації лейкоцитів з хлорохіном. Дана тенденція

( $p < 0.05$ ). The spontaneous level of LC3B protein in PB monocytes of the servicemen of subgroup B2 showed a tendency to increase compared to the level of individuals of subgroup K2.

Since the LC3B protein has 2 forms – cytosolic LC3-I and autophagosome-associated LC3-II, which degrades after the formation of an autolysosome, to measure the levels of LC3B protein located on autophagosomes, an inhibitor of autophagosome-lysosome fusion, chloroquine diphosphate, was added to the PB leukocytes. After the addition of chloroquine, the level of LC3B protein in the PB lymphocytes of the combined group of servicemen was lower ( $p < 0.05$ ) than in the control group (Table 4). Even though the servicemen of subgroup B1 were younger than the clean-up workers, a tendency towards a decrease in the level of LC3B protein on autophagosomes in PB lymphocytes was observed in both groups after incubation with chloroquine, compared with the parameter for subgroup K1. In addition, this trend was maintained when comparing this parameter of the clean-up workers with individuals from subgroup K2. The obtained trend among the clean-up workers was due to a decrease in the indicator among individuals with  $D < 100$  mSv ( $p < 0.05$ ) compared to individuals from both subgroups of the control group (see Table 4).

A tendency towards a decrease in the LC3B protein level on autophagosomes in monocytes of the PB of servicemen of subgroup B1 and individuals of subgroup K2 was revealed compared to the indicator of individuals of subgroup K1 after incubation of leuko-

#### Таблиця 4

Рівень білка LC3B у лейкоцитах ПК осіб груп обстеження після інкубації лейкоцитів з хлорохіном, ( $M \pm SD$ )

Table 4

The level of LC3B protein in PB leukocytes of individuals of the study groups after incubation of leukocytes with chloroquine, ( $M \pm SD$ )

Групи обстеження / Study groups	MFI LC3B у лімфоцитах, у. о. lymphocytes, c.u.	MFI LC3B у моноцитах, у. о. monocytes, c.u.	MFI LC3B у гранулоцитах, у. о. granulocytes, c.u.
Контрольна група / Control group	6088,13 ± 2783,48	11188,41 ± 4987,45	12021,59 ± 5605,78
підгрупа K1 / subgroup K1 (вік / age < 50)	6495,00 ± 2969,25	13392,80 ± 5848,18	14430,78 ± 6291,37
підгрупа K2 / subgroup K2 (вік / age ≥ 50)	5775,15 ± 2710,69	9351,42 ± 3377,32	10353,69 ± 4608,57
Основна група – військовослужбовці / Main group – servicemen	4555,91 ± 2071,12*	10636,17 ± 7394,79	10676,26 ± 5745,63*
підгрупа B1 / subgroup B1 (вік / age < 50)	4201,38 ± 1969,77	8711,46 ± 6220,96	9592,77 ± 4960,78**
підгрупа B2 / subgroup B2 (вік / age ≥ 50)	5016,80 ± 2212,38	13138,30 ± 8352,35	12084,80 ± 6632,05
Учасники ЛНА на ЧАЕС / Clean-up workers	4945,39 ± 3891,62	9353,91 ± 6417,56	9434,93 ± 5663,54**
D < 100 мЗв / D < 100 mSv	3768,26 ± 2094,37**,#	7971,65 ± 4137,96**	9013,05 ± 4102,76**
100 < D < 500 мЗв / 100 < D < 500 mSv	5738,72 ± 4887,97	10131,56 ± 7310,83	9827,04 ± 6493,36**
D ≥ 500 мЗв / D ≥ 500 mSv	5307,14 ± 3211,68	7603,85 ± 3555,68	7027,14 ± 2887,80**

Примітки. \* $p < 0,05$  порівняно з контрольною групою; \*\* $p < 0,05$  порівняно з підгрупою K1 (вік < 50); # $p < 0,05$  порівняно з підгрупою K2 (вік ≥ 50)

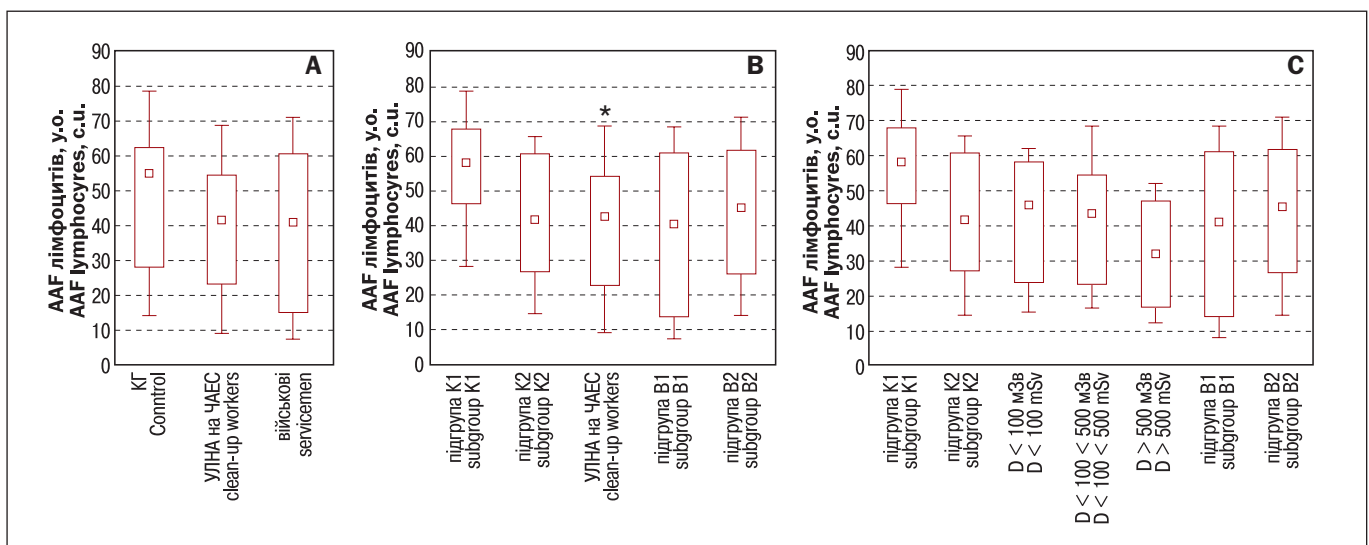
Notes. \* $p < 0.05$  significant differences with the control group; \*\* $p < 0.05$  significant differences with the subgroup K1 (age < 50); # $p < 0.05$  significant differences with the subgroup K2 (age ≥ 50)

зберігалася і в учасників ЛНА на ЧАЕС, що обумовлено статистично значущими змінами показника осіб з  $D < 100$  мЗв ( $p < 0,05$ ) і тенденцією до змін в осіб з  $D \geq 500$  мЗв. Крім того, в учасників ЛНА на ЧАЕС з  $D < 100$  мЗв визначено тенденцію до зниження рівня експресії білка LC3В на аутофосомах у моноцитах ПК після інкубації з хлорохіном, порівняно з показником військовослужбовців підгрупи В2. При порівнянні показників білка LC3В у гранулоцитах ПК після інкубації з хлорохіном, в об'єднаній групі військовослужбовців даний показник був нижчий ( $p < 0,05$ ), ніж в осіб контрольної групи, що обумовлено статистично значущим ( $p < 0,05$ ) зниженням показника у військовослужбовців підгрупи В1, порівняно з показником осіб підгрупи К1. В учасників ЛНА на ЧАЕС також спостерігалася зниження ( $p < 0,05$ ) рівня білка LC3В у гранулоцитах ПК після інкубації з хлорохіном, порівняно з показником осіб підгрупи К1 (табл. 4).

Дослідження показника ААФ у лімфоцитах ПК не виявило статистично значущої відмінності між особами груп обстеження, без урахування віку, але показало зниження даного показника ( $p < 0,05$ ) в учасників ЛНА на ЧАЕС порівняно з особами підгрупи К1 (див. рис. 2, А, В). Виявлено тенденцію до зниження показника ААФ у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС з  $100 < D < 500$  мЗв і

cytes with chloroquine. This tendency was also maintained in the clean-up workers, which is due to statistically significant changes in the parameters of individuals with  $D < 100$  mSv ( $p < 0.05$ ) and a tendency towards changes in individuals with  $D \geq 500$  mSv. In addition, a tendency towards a decrease in the level of LC3B protein expression on autophagosomes in PB monocytes after incubation with chloroquine was determined in the clean-up workers with  $D < 100$  mSv compared to the parameter of servicemen of subgroup B2. When comparing the LC3B protein levels in PB granulocytes after incubation with chloroquine, this level was lower ( $p < 0.05$ ) in the combined group of servicemen than in the control group, which was due to a statistically significant ( $p < 0.05$ ) decrease in the level in the B1 subgroup compared to the K1 subgroup. The clean-up workers also showed a decrease ( $p < 0.05$ ) in the LC3B protein level in PB granulocytes after incubation with chloroquine compared to the K1 subgroup (Table 4).

The study of the AAF in PB lymphocytes did not reveal any statistically significant difference between the individuals of the study groups, regardless of age, but showed a decrease in this parameter ( $p < 0.05$ ) in the clean-up workers compared to the individuals of subgroup K1 (see Fig. 2, A, B). A tendency was revealed for the AAF to decrease in the PB lymphocytes of the clean-up workers from  $100 < D < 500$  mSv



**Рисунок 2.** Показник ААФ лімфоцитів ПК осіб груп обстеження: А – в об'єднаних за віком контрольній групі і групі військовослужбовців; В – залежно від віку; С – залежно від дози опромінення учасників ЛНА на ЧАЕС, Ме [Q1; Q2]

\* $p < 0,05$  порівняно з підгрупою К1 (вік < 50)

**Figure 2.** The AAF of PB lymphocytes of individuals of the study groups: А – in the age-matched control group and group of servicemen; В – depending on age; С – depending on the radiation dose of clean-up workers, Me [Q1; Q2]

\* $p < 0.05$  compared to subgroup K1 (age < 50)

$D \geq 500$  мЗв порівняно з показником осіб підгрупи K1 (рис. 2, C).

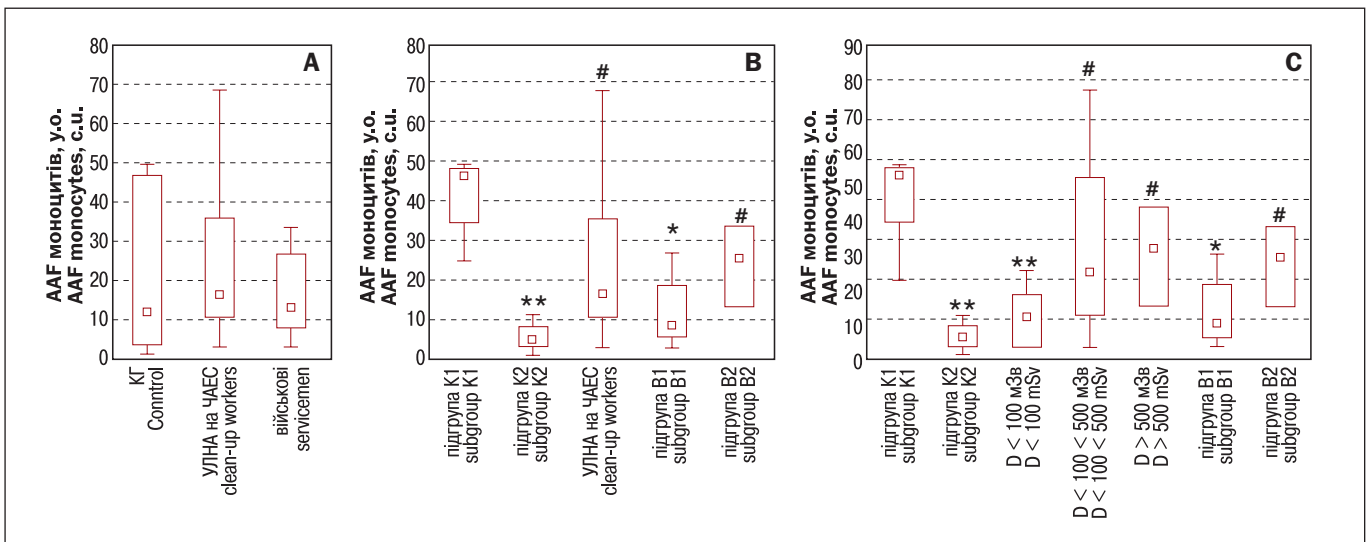
Не знайдено відмінностей між показниками ААФ у моноцитах ПК осіб груп обстеження, без урахування віку (рис. 3, А). В осіб підгрупи K2 визначено зниження показника ААФ у моноцитах ПК ( $p < 0,01$ ), порівняно з показниками осіб підгрупи K1. У військовослужбовців підгрупи B2 та учасників ЛНА на ЧАЕС визначено зростання показника ААФ у моноцитах ПК ( $p < 0,05$ ) порівняно з показником осіб підгрупи K2. Зниження даного показника спостерігалось у військовослужбовців підгрупи B1 ( $p < 0,05$ ) і учасників ЛНА на ЧАЕС (без статистичної значущості) відносно показника осіб підгрупи K1 (рис. 3, В). Зростання показника ААФ у моноцитах ПК виявлено в учасників ЛНА на ЧАЕС з  $100 < D < 500$  мЗв і  $D \geq 500$  мЗв ( $p < 0,05$ ) порівняно з показником осіб підгрупи K2, і зниження в учасників ЛНА на ЧАЕС з  $D < 100$  мЗв та осіб підгрупи K2 ( $p < 0,01$ ) порівняно з показником осіб підгрупи K1 (рис. 3, С).

При порівнянні показників ААФ у гранулоцитах ПК осіб груп обстеження, відмічено наявність тенденції до зниження показника у військовослужбовців, з більш вираженим зниженням у підгрупі B2 відносно осіб контрольної групи, зокрема осіб підгрупи K1 (рис. 4, А, В). Відмічене зниження показника в учасників ЛНА на ЧАЕС з  $D \geq 500$  мЗв

and  $D \geq 500$  mSv compared to the parameter of the individuals of subgroup K1 (Fig. 2, C).

No differences were found between the AAF in PB monocytes of the individuals of the study groups, regardless of age (Fig. 3, A). In individuals of subgroup K2, a decrease in the AAF in PB monocytes was determined ( $p < 0,01$ ) compared to the parameter of the individuals of subgroup K1. The AAF in PB monocytes was found to increase in the servicemen of subgroup B2 serviceme and the clean-up workers ( $p < 0,05$ ) compared to the parameter in subgroup K2. The AAF decreased in the servicemen of subgroup B1 ( $p < 0,05$ ) and the clean-up workers (without statistical significance) compared to the parameter in subgroup K1 (Fig. 3, B). The AAF increased in the PB monocytes in the clean-up workers with  $100 < D < 500$  mSv and  $D \geq 500$  mSv ( $p < 0,05$ ) compared to the parameter in subgroup K2, and decreased in the clean-up workers with  $D < 100$  mSv and subgroup K2 ( $p < 0,01$ ) compared to the parameter in subgroup K1 (Fig. 3, C).

When comparing the AAF in the PB granulocytes of the individuals in the study groups, a tendency towards a decrease in the parameter was noted in the servicemen with a more pronounced decrease in the subgroup B2 about the individuals in the control group, in particular, the individuals in the subgroup K1 (Fig. 4, A, B). A decrease in the AAF was noted in the clean-up work-

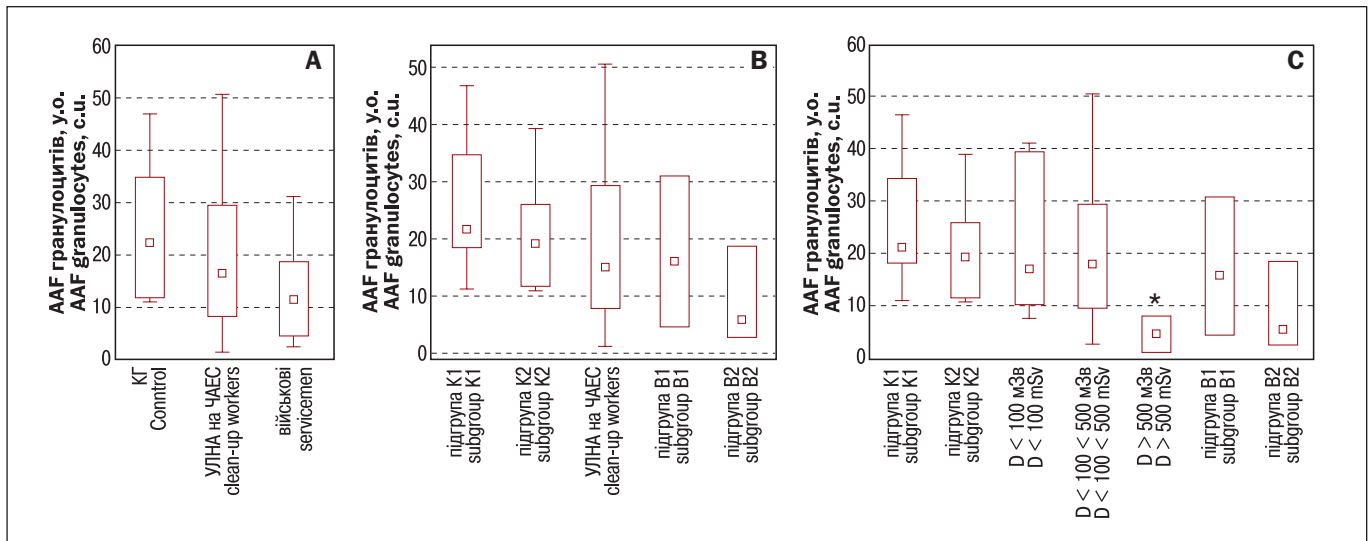


**Рисунок 3.** Показник ААФ моноцитів ПК осіб груп обстеження: А – в об'єднаних за віком контрольній групі і групі військовослужбовців; В – залежно від віку; С – залежно від дози опромінення учасників ЛНА на ЧАЕС, Ме [Q1; Q2]

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  порівняно з підгрупою K1 (вік < 50); # $p < 0,05$  порівняно з підгрупою K2 (вік  $\geq 50$ )

**Figure 3.** The AAF of PB monocytes of individuals of the study groups: A – in the age-matched control group and group of servicemen; B – depending on age; C – depending on the radiation dose of clean-up workers, Me [Q1; Q2]

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  compared to subgroup K1 (age < 50); # $p < 0,05$  compared to subgroup K2 (age  $\geq 50$ )



**Рисунок 4.** Показник ААГ гранулоцитів ПК осіб груп обстеження: А – в об’єднаних за віком контрольній групі і групі військовослужбовців; В – залежно від віку; С – залежно від дози опромінення учасників ЛНА на ЧАЕС, Ме [Q1; Q2]

\* $p < 0,05$  порівняно з підгрупою K1 (вік < 50)

**Figure 4.** The AAF of PB granulocytes of individuals of the study groups: A – in the age-matched control group and group of servicemen; B – depending on age; C – depending on the radiation dose of clean-up workers, Me [Q1; Q2]

\* $p < 0,05$  compared to subgroup K1 (age < 50)

відносно показника осіб підгруп K1 ( $p < 0,05$ ) і K2 (рис. 4, С).

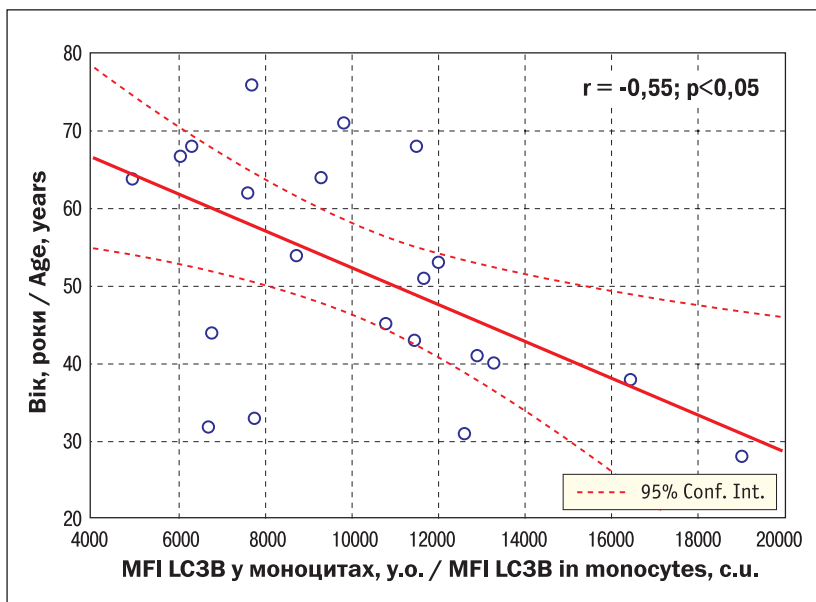
Кореляційний аналіз (рис. 5) показав наявність залежності між віком і спонтанним рівнем білка LC3B у моноцитах ПК в осіб контрольної групи (28–77 років). Не було знайдено кореляцій між віком і спонтанним рівнем білка LC3B та ААГ у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС та військовослужбовців Сил оборони України.

Результати досліджень експресії генів аутофагії у лейкоцитах ПК наведено на рис. 6. Учасників

ers with  $D \geq 500$  mSv about the parameter in the individuals of the subgroups K1 ( $p < 0.05$ ) and K2 (Fig. 4, C).

Correlation analysis (Fig. 5) showed a relationship between age and the spontaneous level of LC3B protein in the PB monocytes of the individuals in the control group (28–77 years old). No correlations were found between the age and spontaneous level of LC3B protein and the AAF in the PB leukocytes of the clean-up workers and the servicemen of the Defense Forces of Ukraine.

The results of the studies of the expression of autophagy genes in the PB leukocytes are presented in



**Рисунок 5.** Кореляційний аналіз між віком та спонтанним рівнем білка LC3B у моноцитах ПК осіб контрольної групи  
**Figure 5.** Correlation analysis between age and the spontaneous level of LC3B protein in PB monocytes of control group



ЛНА на ЧАЕС було розподілено на 2 підгрупи: I – з  $D < 100$  мЗв і II – з  $D \geq 100$  мЗв, оскільки дослідження генної експресії було розділено на етапи і на першому етапі ПЛР виконано для 14 зразків ПК даної групи обстеження.

Зниження відносного рівня експресії *MTOR* у лейкоцитах ПК спостерігалось в учасників ЛНА на ЧАЕС, у тому числі з  $D < 100$  мЗв, і військовослужбовців, зокрема в осіб підгрупи B1 ( $p < 0,05$ ) відносно осіб підгрупи K1 (рис. 6). Натомість не виявлено статистично значущих змін відносного рівня експресії *PRKAA1* в осіб груп обстеження (рис. 6, А, В).

Не було знайдено відмінностей між рівнями експресії *ULK1* і *RBICC1* у лейкоцитах ПК в осіб груп обстеження, незалежно від віку (див. рис. 6, А). Відмічене підвищення рівня експресії *ULK1* у лейкоцитах ПК військовослужбовців підгрупи B2 порівняно з військовослужбовцями підгрупи B1 без статистичної значущості (рис. 6, В) та учасниками ЛНА на ЧАЕС з  $D < 100$  мЗв ( $p < 0,05$ ), рис. 6, С. Також встановлено тенденцію до зниження відносного рівня експресії *RBICC1* у лейкоцитах ПК військовослужбовців підгрупи B1, учасників ЛНА на ЧАЕС та осіб підгрупи K2 порівняно з показником осіб підгрупи K1 (рис. 6, В). Найнижчі показники *RBICC1* ( $p < 0,05$ ) спостерігалися в учасників ЛНА на ЧАЕС з  $D < 100$  мЗв (рис. 6, С).

Спостерігалася тенденція до зниження відносного рівня експресії гена *BECN1* в учасників ЛНА на ЧАЕС відносно військовослужбовців (рис. 6, А). Лише у військовослужбовців підгрупи B2 відмічена тенденція до підвищення рівня експресії *PIK3C3* у лейкоцитах ПК порівняно з показником осіб підгрупи K2 і учасників ЛНА на ЧАЕС (рис. 6, В).

Показники відносного рівня експресії *ATG5* у лейкоцитах ПК осіб груп обстеження не мали суттєвих відмінностей (рис. 6, А, В). В учасників ЛНА на ЧАЕС встановлено зниження відносного рівня експресії *MAP1LC3B* у лейкоцитах ПК ( $p < 0,05$ ) відносно осіб контрольної групи (рис. 6, А). Дані відмінності зберігалися у вигляді тенденції при порівнянні показників учасників ЛНА на ЧАЕС, в тому числі з  $D \geq 100$  мЗв, з показниками осіб підгрупи K2 і військовослужбовців підгрупи B2 (рис. 6, В, С). Тенденція до зменшення рівнів експресії *MAP1LC3B* спостерігалася у військовослужбовців підгрупи B1, порівняно з показником осіб підгрупи K1 і військовослужбовців підгрупи B2 (рис. 6, В).

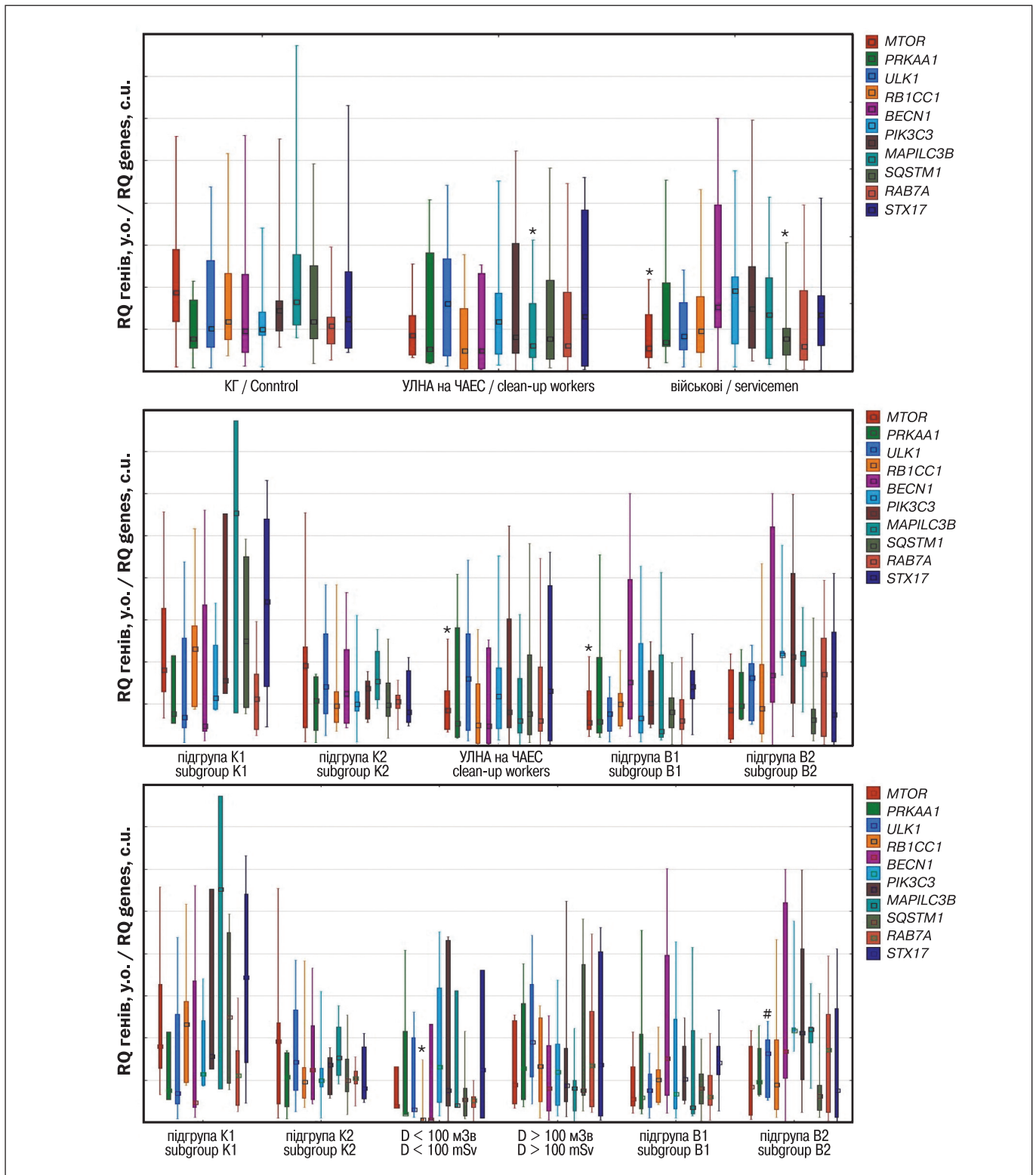
Fig. 6. The clean-up workers were divided into 2 subgroups: I – with  $D < 100$  mSv and II – with  $D \geq 100$  mSv, since the gene expression study was divided into stages and at the first stage PCR was performed for 14 PB samples of this study group.

A decrease in the relative level of *MTOR* expression in PB leukocytes was observed in the clean-up workers, including those with  $D < 100$  mSv, and in the servicemen, in particular in individuals of subgroup B1 ( $p < 0.05$ ) about individuals of subgroup K1 (Fig. 6). No statistically significant changes in the relative level of *PRKAA1* expression were found in individuals of the study groups (Fig. 6, A, B).

No differences were found between the relative levels of *ULK1* and *RBICC1* expression in PB leukocytes in individuals of the study groups, regardless of age (see Fig. 6, A). An increase in the level of *ULK1* expression in PB leukocytes was noted in the servicemen of subgroup B2 compared to subgroup B1 without statistical significance (Fig. 6, B) and in the clean-up workers with  $D < 100$  mSv ( $p < 0.05$ ), Fig. 6, C. A tendency towards a decrease in the relative level of *RBICC1* expression in PB leukocytes of the servicemen of subgroup B1, clean-up workers and individuals of subgroup K2 was also established compared to the parameter of individuals of subgroup K1 (Fig. 6, B). The lowest relative level of *RBICC1* expression ( $p < 0.05$ ) was observed in the clean-up workers with  $D < 100$  mSv (Fig. 6, C).

A tendency towards a decrease in the relative level of *BECN1* expression was observed in the clean-up workers compared to the servicemen (Fig. 6, A). Only the servicemen of subgroup B2 showed a tendency towards an increase in the relative level of *PIK3C3* expression in the PB leukocytes compared to the parameter of the individuals of subgroup K2 and the clean-up workers (Fig. 6, B).

The parameter of the relative level of *ATG5* expression in the PB leukocytes of the individuals of the study groups did not have significant differences (Fig. 6, A, B). The clean-up workers showed a decrease in the relative level of *MAP1LC3B* expression in the PB leukocytes ( $p < 0.05$ ) compared to the individuals of the control group (Fig. 6, A). These differences remained as a tendency when comparing the parameters of the clean-up workers, including those with  $D \geq 100$  mSv, with the parameters of the individuals of subgroup K2 and the servicemen of subgroup B2 (Fig. 6, B, C). A tendency towards a decrease in the relative levels of *MAP1LC3B* expression was observed in the servicemen of subgroup B1 compared to the parameter of individuals of subgroup K1 and servicemen of subgroup B2 (Fig. 6, B).



**Рисунок 6.** Відносний рівень експресії генів аутофагії у лейкоцитах ПК осіб груп обстеження: А – в об’єднаних за віком контрольній групі і групі військовослужбовців; В – залежно від віку; С – залежно від дози опромінення учасників ЛНА на ЧАЕС, Ме [Q1; Q2]

\* $p < 0,05$  порівняно з контрольною групою; \* $p < 0,05$  порівняно з підгрупою K1 (вік < 50); # $p < 0,05$  порівняно з учасниками ЛНА на ЧАЕС з  $D < 100$  мЗв.

**Figure 6.** The relative expression level of autophagy genes in PB leukocytes of individuals of the study groups: А – in the age-matched control group and group of servicemen; В – depending on age; С – depending on the radiation dose of clean-up workers, Me [Q1; Q2]

\* $p < 0,05$  compared to control group; \* $p < 0,05$  compared to subgroup K1 (age < 50); # $p < 0,05$  compared to clean-up workers ( $D < 100$  mSv)

Визначено зниження відносного рівня експресії *SQSTM1* ( $p < 0,05$ ) у військовослужбовців порівняно з показником осіб контрольної групи (рис. 6, А), що зберігалось у вигляді тенденції у військовослужбовців обох підгруп при порівнянні з показником осіб підгрупи К1 (рис. 6, В). Подібні відмінності були й в учасників ЛНА на ЧАЕС, у тому числі з  $D < 100$  мЗв порівняно з особами підгрупи К1 (рис. 6, В, С). Не було встановлено статистично значущих змін між відносними рівнями експресії *RAB7A* і *STX17* у лейкоцитах ПК осіб груп обстеження (рис. 6).

Не знайдено статистично значущих кореляцій між віком або дозою опромінення і відносним рівнем експресії генів аутофагії у лейкоцитах ПК осіб груп обстеження.

## ОБГОВОРЕННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

Багаторічні дослідження розкривають вирішальну роль аутофагії та її білків у функціонуванні імунної системи. Аутофагія підтримує баланс імунної відповіді, захищаючи організм від інфекційних, аутоімунних захворювань і патологій, асоційованих із запаленням [21, 22]. Розвиток захворювань пов'язаний як з порушенням функціонування аутофагії у клітинах імунної системи, так і в інших соматичних клітинах організму.

Аутофагія має важливий вплив на індукування та модуляцію запальної реакції. Зниження аутофагії під час старіння призводить до порушення функціонування клітин, зокрема накопичення деполаризованих мітохондрій, що вивільняють активатори інфламасоми, такі як активні форми кисню (АФК) або мітохондріальна ДНК (мтДНК) [5], що стимулює сигналізацію NF- $\kappa$ B, активацію інфламасом і запуск механізмів розвитку SASP [1]. У свою чергу запалення призводить до подальшого пригнічення аутофагії, створюючи замкнений ланцюг: аутофагія може бути активована імунними сигналами, а запалення може бути спричинене аутофагією. Показано, що одні цитокіни, зокрема IL-1 або IL-6, активують аутофагію, тоді як інші, наприклад IL-10 й IL-13, мають інгібуючу дію [23]. TNF- $\alpha$  може активувати або пригнічувати аутофагію шляхом, залежним від NF- $\kappa$ B і продукції АФК. За наявності сигналізації NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  активує mTOR, основний інгібітор аутофагії, тоді як у клітинах, у яких відсутня активація NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  навпаки стимулює експресію білка аутофагії Beclin 1 [24]. Сама аутофагія також регулює синтез і секрецію цитокінів, у тому числі IL-1, IL-18, TNF- $\alpha$  й IFN I типу [23, 25].

A decrease in the relative level of *SQSTM1* expression ( $p < 0,05$ ) was determined in the servicemen compared to the parameter of the control group (Fig. 6, A), which was preserved as a trend in the servicemen of both subgroups when compared with the parameter of subgroup K1 (Fig. 6, B). Similar differences were also found in the clean-up workers, including those with  $D < 100$  mSv compared to subgroup K1 (Fig. 6, B, C). No statistically significant changes were found between the relative levels of *RAB7A* and *STX17* expression in the PB leukocytes of the individuals in the study groups (Fig. 6).

No statistically significant correlations were found between age or radiation dose and the relative expression level of autophagy genes in the PB leukocytes of the individuals in the study groups.

## DISCUSSION

Long-term studies reveal the crucial role of autophagy and its proteins in the functioning of the immune system. Autophagy maintains the balance of the immune response, protecting the body from infectious, autoimmune diseases and pathologies associated with inflammation [21, 22]. The development of diseases is associated with both impaired autophagy in the cells of the immune system and other somatic cells.

Autophagy has an important effect on the induction and modulation of the inflammatory response. A decrease in autophagy during aging leads to impaired cell function, in particular the accumulation of depolarized mitochondria that release inflammasome activators such as reactive oxygen species (ROS) or mitochondrial DNA (mtDNA) [5], which stimulates NF- $\kappa$ B signaling and triggers the mechanisms of SASP development [1]. In turn, inflammation leads to further suppression of autophagy, creating a vicious cycle: autophagy can be activated by immune signals, and inflammation can be induced by autophagy. Some cytokines, in particular IL-1 or IL-6, have been shown to activate autophagy, while others, such as IL-10 and IL-13, have an inhibitory effect [23]. TNF- $\alpha$  can activate or suppress autophagy in a pathway dependent on NF- $\kappa$ B and ROS production. In the presence of NF- $\kappa$ B signaling, TNF- $\alpha$  activates mTOR, the main inhibitor of autophagy, whereas, in cells lacking NF- $\kappa$ B activation, TNF- $\alpha$  conversely stimulates the expression of the autophagy protein Beclin 1 [24]. Autophagy also regulates the synthesis and secretion of cytokines, including IL-1, IL-18, TNF- $\alpha$  and type I IFN [23], [25].



Дефекти аутофагії в імунних клітинах супроводжують природне старіння людей, змінюють мітохондріальну біоенергетику та посилюють активацію Th17 [26], впливають на метаболічний статус лейкоцитів під час їх диференціації через каскади сигналізації AMPK і mTOR [5]. Енергетична недостатність імунних клітин може позбавити імунну систему необхідних ефektorів через надмірну загибель цих клітин, що зрештою призводить до посиленої компенсаторної проліферації та сприяє зростанню кількості аутореактивних клітин [27]. Фармакологічна активація аутофагії, наприклад, шляхом інгібування mTOR рапаміцином, може збільшити тривалість життя мишей, що демонструє роль сигналізації mTOR у регуляції тривалості життя ссавців [28].

У нашому дослідженні показники спонтанного рівня білка LC3B, його накопичення після інкубування з хлорохіном, й ААФ у гранулоцитах і лімфоцитах цивільних осіб, віком як до 50 років, так і після, були схожими. Натомість у моноцитах ПК цивільних осіб, старше 50 років, рівні білка LC3B були нижчими, як без, так і з інкубуванням з хлорохіном, що позначилося на показнику ААФ і може бути пояснено знайденою віковою залежністю продукції білка LC3B. Отримані нами результати можливо пов'язані з тривалістю життя лейкоцитів, їхньою здатністю до підтримки гомеостазу і часом циркуляції у ПК [29]. Так, нейтрофіли через коротку тривалість циркуляції у ПК і загалом короткий життєвий цикл не встигають накопичити пошкодження, запустити механізм клітинного старіння, що відобразилося б на функціональному стані аутофагії. Крім того в активованих нейтрофілах активується каспазо-незалежна форма клітинної загибелі, пов'язана з аутофагією [30], що також може впливати на загальний показник активності аутофагії, ймовірно, через зміни у балансі між активованими і неактивованими гранулоцитами.

Моноцити, хоча теж є короткоживучими, але виконують функцію антиген-презентуючих клітин, а фагоцитоз залежить від аутофагії [31]. Тому, можливо, зниження показників аутофагії у моноцитах осіб старшого віку пов'язане саме з порушенням функцій власне моноцитів. Так, здатність тканинно-резидентних макрофагів відновлювати гомеостаз тканин за допомогою протеасомної деградації та аутофагії знижується з віком, що призводить до аномального функціонування клітин [32]. Хоча нами не знайдено статистично значущих змін експресії генів у цивільних осіб, дослідження [33] показали позитивну кореляцію між віком і генами, що кодують інгібітори

Defects in autophagy in immune cells accompany natural human aging, alter mitochondrial bioenergetics, enhance Th17 activation [26], and affect the metabolic status of leukocytes during their differentiation via the AMPK and mTOR signaling cascades [5]. Energy insufficiency of immune cells can deprive the immune system of essential effectors due to excessive cell death, which ultimately leads to increased compensatory proliferation and promotes an increase in the number of autoreactive cells [27]. Pharmacological activation of autophagy, for example, by inhibiting mTOR with rapamycin, can extend the lifespan of mice, demonstrating a role for mTOR signaling in regulating mammalian lifespan [28].

In our study, the spontaneous level of LC3B protein, its accumulation after incubation with chloroquine and AAF in granulocytes and lymphocytes of the civilians, both under and after 50 years of age, were similar. In the PB monocytes of the civilians over 50 years of age, the levels of LC3B protein were lower, both without and with incubation with chloroquine, which affected the AAF and can be explained by the age dependence of LC3B protein production found. Our results may be associated with the lifespan of leukocytes, their ability to maintain homeostasis and the time of circulation in PB [29]. Thus, neutrophils, due to the short duration of circulation in PB and a short life cycle, do not have time to accumulate damage, and start the mechanism of cellular aging, which would affect the functional state of autophagy. In addition, caspase-independent autophagy-associated cell death is activated in activated neutrophils [30], which may also influence the overall autophagy activity rate, likely due to changes in the balance between activated and non-activated granulocytes.

Monocytes, although also short-lived, perform the function of antigen-presenting cells, and phagocytosis depends on autophagy [31]. Therefore, the decrease in autophagy indices in monocytes of older individuals may be associated with the dysfunction of monocytes themselves. Thus, the ability of tissue-resident macrophages to restore tissue homeostasis using proteasomal degradation and autophagy decreases with age, which leads to abnormal cell functioning [32]. Although we did not find statistically significant changes in gene expression in civilians, studies [33] showed a positive correlation between age and



аутофагії в моноцитах ПК (*MCL1, BCL2, BCL2L2, MTOR, IL10RA, STAT3, JAK1, PDPK1, IL2RB*), і негативну – з генами, що кодуєть активатори аутофагії (*BAD, BID, PRKAG1*) та білки апарату аутофагії (*ATG3, ATG5, ATG7* і *GABARAPL2*), хоча експресія генів *BECN1* та *ULK1* з віком збільшувалася.

Лімфоцити є довгоживучими клітинами, тому повинні бути стійкішими до дії різноманітних чинників, для того щоб мати спроможність виконувати свої функції. Лімфоцити – гетерогенна популяція, тому ми не можемо стверджувати, що вікові зміни не торкнулися їх, оскільки дослідження проводилося лише в загальній популяції без диференціювання на субпопуляції, що може спотворювати реальну картину. Виявлено, що зниження активності аутофагії призводить до порушення реакцій В-клітин пам'яті у людей похилого віку [34]. CD3<sup>+</sup> Т-лімфоцити характеризуються вищими рівнями аутофагії, ніж CD19<sup>+</sup> В-лімфоцити [35]. З віком активність аутофагії у Т-лімфоцитах знижується [35]. Так, в осіб похилого віку відбувається накопичення високодиференційованих CD8<sup>+</sup>28<sup>-</sup> Т-лімфоцитів, що індукують аутофагію значно меншою мірою у відповідь на активацію TCR порівняно з CD8<sup>+</sup>28<sup>+</sup> Т-лімфоцитами, що передбачає, що вони не можуть задовольнити метаболічні потреби активації, опосередкованої антигенним рецептором і тому навряд чи виживуть при розпізнаванні своїх специфічних антигенів [36]. Також спостерігається підвищення кількості мітохондріальних білків у CD4<sup>+</sup> Т-лімфоцитах з переважним порушенням регуляції молекулярних шляхів окисного фосфорилування та енергетичного метаболізму, що пов'язано з накопиченням аутофагосом з недеградованими мітохондріями [37]. Виявлено, що спадковість відіграє важливу роль: активність аутофагії у CD4<sup>+</sup> Т-лімфоцитах значно краща в осіб, члени родини яких були довгожителами [38].

Організм військовослужбовців зазнає дії різноманітних екзо- та ендогенних стресорних чинників. Відповідь на них розпочинається від клітинного до організменного рівнів, але при великій кількості постійно діючих негативних факторів, зростає ймовірність збереження порушення гомеостазу й активації патологічних механізмів. У нашому дослідженні у військовослужбовців Сил оборони України обох вікових груп показники спонтанного рівня білка LC3B у лімфоцитах і гранулоцитах ПК були подібними до показників цивільних осіб відповідного віку, проте хлорокін-індуковане нако-

genes encoding inhibitors of autophagy in PB monocytes (*MCL1, BCL2, BCL2L2, MTOR, IL10RA, STAT3, JAK1, PDPK1, IL2RB*) and a negative correlation with genes encoding activators of autophagy (*BAD, BID, PRKAG1*) and proteins of the autophagy apparatus (*ATG3, ATG5, ATG7, GABARAPL2*), although the expression of the *BECN1* and *ULK1* increased with age.

Lymphocytes are long-lived cells, so they must be more resistant to various factors to be able to perform their functions. Lymphocytes are a heterogeneous population, so we cannot claim that age-related changes have not affected them, since the study was conducted only in the general population without differentiation into subpopulations, which may distort the real picture. It was found that a decrease in autophagy activity leads to a violation of the reactions of memory B cells in elderly people [34]. CD3<sup>+</sup> T-lymphocytes are characterized by higher levels of autophagy than CD19<sup>+</sup> B-lymphocytes [35]. With age, autophagy activity in T-lymphocytes decreases [35]. Thus, in older individuals, there is an accumulation of highly differentiated CD8<sup>+</sup>28<sup>-</sup> T-lymphocytes that induce autophagy to a significantly lesser extent in response to TCR activation compared to CD8<sup>+</sup>28<sup>+</sup> T-lymphocytes, suggesting that they cannot meet the metabolic demands of antigen receptor-mediated activation and are therefore unlikely to survive recognition of their specific antigens [36]. There is also an increase in the number of mitochondrial proteins in CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes with a predominant impairment of the regulation of the molecular pathways of oxidative phosphorylation and energy metabolism, which is associated with the accumulation of autophagosomes with undegraded mitochondria [37]. Heredity has been shown to play an important role: autophagic activity in CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes is significantly higher in individuals whose family members were centenarians [38].

The organism of servicemen is exposed to various exogenous and endogenous stress factors. The response to them begins at the cellular to organismal levels, but with a large number of constantly acting negative factors, the probability of maintaining homeostasis disorder and activation of pathological mechanisms increases. In our study, in the servicemen of the Defense Forces of Ukraine of both age groups, the spontaneous levels of LC3B protein in PB lymphocytes and granulocytes were similar to those of the civilians of the corresponding age, but chloroquine-induced accumulation of LC3B pro-

пичення білка LC3B у лімфоцитах і гранулоцитах ПК було менш інтенсивним у військовослужбовців, молодше 50 років. При цьому показник ААФ лімфоцитів ПК не зазнав суттєвих змін, а показник ААФ гранулоцитів знижувався, особливо в осіб старшого віку. Показник спонтанного рівня білка LC3B і ААФ у моноцитах ПК військовослужбовців, старше 50 років був дещо вищий, ніж у цивільних осіб того ж віку. Натомість накопичення білка LC3B у моноцитах ПК було знижене у військовослужбовців, молодше 50 років, що позначилося на показнику ААФ. Зміни торкнулися й показників експресії генів. Так, нами було виявлено зниження експресії *MTOR* у військовослужбовців, молодше 50 років, а показник експресії *PRKAA1* – другого регулятора аутофагії не був змінений. Крім того, знижувалася експресія *RBICC1* і *MAP1LC3B*. У військовослужбовців, старше 50 років, експресія гена *ULK1* і *MAP1LC3B* була вищою, ніж у військовослужбовців молодшого віку, а *PIK3C3* – вищою, ніж у цивільних осіб їх віку. Лише експресія одного гена була знижена в обох групах військовослужбовців – *SQSTM1*. Загалом низькі рівні експресії *MTOR* разом з відсутністю змін в експресії *PRKAA1* у військовослужбовців, молодше 50 років, могли б свідчити про посилення активності аутофагії. Натомість зниження експресії генів *RBICC1*, *MAP1LC3B* і *SQSTM1* разом з визначеними рівнями білка LC3B і показниками ААФ лейкоцитів ПК може вказувати на порушення процесу самої збірки аутофагосоми, селективного розпізнавання мішеней та її злиття з лізосоною, навіть за умови коректного надходження активаційних сигналів. Підвищення рівня експресії *ULK1*, *MAP1LC3B* і *PIK3C3* на тлі високих показників ААФ у моноцитах ПК військовослужбовців, які старше 50 років, вказує на ймовірне посилення процесу аутофагії у моноцитах порівняно з цивільними особами того ж віку, яке втім не досягає показників цивільних осіб, молодше 50 років. Проте, зважаючи на знижену експресію *SQSTM1*, можна припустити зниження ефективності селективної аутофагії, незважаючи на високі показники її активації. Пригнічення аутофагії у військовослужбовців, молодше 50 років, ймовірно пов'язане з інфекційними агентами, що прямо діють на клітини імунної системи, та фізичним і психоемоційним навантаженнями, що діють опосередковано через гормональні та нейроендокринні зміни і зрештою знижують здатність клітин ефективно регулювати механізми клітинного гомеостазу.

tein in lymphocytes and granulocytes was less intense in the servicemen under 50 years of age. At the same time, the AAF of PB lymphocytes did not undergo significant changes, and the AAF of granulocytes decreased, especially in older individuals. The spontaneous level of LC3B protein and AAF in PB monocytes of the servicemen over 50 years of age was slightly higher than in the civilians of the same age. The accumulation of LC3B protein in PB monocytes was reduced in the servicemen under 50 years of age, which affected the AAF. The changes also affected the gene expression indices. Thus, we found a decrease in *MTOR* expression in the servicemen under 50 years of age, and the expression of *PRKAA1*, the second autophagy regulator, was not changed. In addition, the expression of *RBICC1* and *MAP1LC3B* decreased. In the servicemen over 50 years of age, the expression of *ULK1* and *MAP1LC3B* was higher than in the younger servicemen, and *PIK3C3* was higher than in the civilians of their age. Only the expression of one gene was reduced in both groups of the servicemen – *SQSTM1*. In general, low levels of *MTOR* expression together with the absence of changes in *PRKAA1* expression in the servicemen under 50 years of age could indicate an increase in autophagy activity. At the same time, the decrease in the expression of the *RBICC1*, *MAP1LC3B* and *SQSTM1*, along with certain levels of LC3B protein and AAF of PB leukocytes, may indicate a disturbance in the process of autophagosome assembly itself, selective target recognition and its fusion with the lysosome, even under the condition of correct receipt of activation signals. The increase in the expression level of *ULK1*, *MAP1LC3B* and *PIK3C3* against the background of high AAF in PB monocytes of the servicemen over 50 years old indicates a probable enhancement of the autophagy process in monocytes compared to the civilians of the same age, but not reaching the indices of the civilians under 50 years old. However, due to the reduced expression of *SQSTM1*, a decrease in the efficiency of selective autophagy can be assumed, despite the high indices of its activation. Suppression of autophagy in servicemen under 50 years of age is probably associated with infectious agents directly affecting the cells of the immune system and physical and psychoemotional stress, acting indirectly due to hormonal and neuroendocrine changes, and ultimately reducing the ability of cells to effectively regulate the mechanisms of cellular homeostasis. Increased AAF in PB monocytes of the servicemen over 50 years of age may be associated with age-relat-

Підвищення AAF аутофагії у моноцитах ПК військовослужбовців, старше 50 років, можливо пов'язане з віковою дисфункцією цих клітин, оскільки під час старіння активізуються хронічні запальні процеси, пов'язані з синтезом інфламасом і прозапальних цитокінів. Можна припустити, що активація аутофагії у моноцитах відбувається у відповідь на порушення запальної відповіді, але разом зі зниженням її активності у гранулоцитах і відсутністю змін у лімфоцитах, може свідчити про підтримку реакції запалення.

Зміни показників аутофагії у військовослужбовців можуть бути частково пов'язані зі шкідливими звичками. Так, куріння впливає на функціонування альвеолярних макрофагів. Альвеолярні макрофаги курців демонструють дефектну аутофагію, що може сприяти накопиченню агрегатів, аномальному функціонуванню мітохондрій і дефектному кліренсу бактерій [39]. Інгібування аутофагії після впливу сигаретного диму посилює накопичення p62 й убіквітинуваних білків в епітеліальних клітинах дихальних шляхів, що призводить до прискорення клітинного старіння та набуття клітинами SASP з продукцією CXCL8, імітуючи зміни, що спостерігаються в клітинах при хронічному обструктивному захворюванні легень [40].

Окрім того, організм військовослужбовців зазнає впливу різних хімічних речовин, що виділяються при застосуванні різного виду зброї. Наприклад, хронічна дія високих або низьких доз бензолу – промислового хімікату, що широко використовується, пов'язана з гематотоксичністю і розвитком апластичної анемії, мієлодиспластичного синдрому і лейкемії. У мононуклеарах кісткового мозку осіб, що зазнали хронічної дії бензолу, спостерігалось посилення аутофагії і зниження рівня p300, це дозволяє припустити, що індукція аутофагії та деацетилювання можуть бути основним механізмом, за допомогою якого бензол викликає гематотоксичність, оскільки гіперактивація аутофагії спричиняє загибель клітин [41]. Люїзит – органічний миш'як, що використовувався як бойова отруйна речовина під час Першої та Другої світових воєн. Люїзит посилював продукцію АФК у нирках мишей, що призводило до активації аутофагії з підвищеною експресією beclin-1, ATG7 та LC-3A/B-II [42]. Людина зазнає токсичної дії кадмію через забруднені ним повітря, воду та харчові продукти, під час куріння і професійних умов [43]. Кадмій індукуює аутофагію, активація якої сприяє апоптозу моноцитів мишей і культури Ramos B-лімфоцитів людини, і зниженню їх життєздатності навіть за умови інгібування апоптозу, що може приз-

ед dysfunction of these cells since chronic inflammatory processes associated with the synthesis of inflammasomes and proinflammatory cytokines are activated during aging. It can be assumed that activation of autophagy in monocytes occurs in response to a violation of the inflammatory response, but together with a decrease in its activation in granulocytes and the absence of changes in lymphocytes, it may indicate support for the inflammatory reaction.

Altered autophagy parameters in the servicemen may be partly related to harmful habits. Smoking affects the functioning of alveolar macrophages. Alveolar macrophages of smokers demonstrate defective autophagy, which may contribute to the accumulation of aggregates, abnormal mitochondrial function, and defective bacterial clearance [39]. Inhibition of autophagy after exposure to cigarette smoke increases the accumulation of p62 and ubiquitinated proteins in airway epithelial cells, which leads to accelerated cellular senescence and the acquisition of SASP by cells with CXCL8 production, mimicking the changes observed in cells with chronic obstructive pulmonary disease [40].

In addition, the organism of the servicemen is exposed to various chemicals released by the use of different types of weapons. For example, chronic exposure to high or low doses of the widely used industrial chemical benzene has been associated with hematotoxicity and the development of aplastic anemia, myelodysplastic syndrome, and leukemia. Increased autophagy and decreased p300 levels were observed in bone marrow mononuclear cells from individuals chronically exposed to benzene, suggesting that induction of autophagy and deacetylation may be the primary mechanism by which benzene causes hematotoxicity, since hyperactivation of autophagy causes cell death [41]. Lewisite is an organic arsenic that was used as a warfare agent during World War I and World War II. Lewisite exacerbated ROS production in mouse kidneys, resulting in the activation of autophagy with increased expression of beclin-1, ATG7, and LC-3A/B-II [42]. Humans are exposed to cadmium toxicity through air, water, and food contamination, smoking, and occupational exposure [43]. Cadmium has been shown to induce autophagy, activation of which promotes apoptosis in mouse monocytes and human Ramos B-lymphocyte cultures, and a decrease in their



вести до порушення імунної відповіді, опосередкованої моноцитами [43, 44]. В осіб, які постраждали від дії іприту, у клітинах легень були підвищені рівні мРНК LC3, проте білок LC3B і співвідношення LC3II/LC3I були знижені [45]. Вихлопні гази дизельних двигунів впливають на життєздатність клітин бронхіального епітелію, посилюючи апоптоз і некроз, збільшуючи аутофагічний потік та індукуючи продукцію IL-18 [46].

При перебуванні у зоні бойових дій можливим є переохолодження, обмороження взимку або тепловий та сонячний удари влітку, а також зміна толерантності організму до надмірної фізичної активності під час дії низьких або високих температур. Гіпотермія є критичним наслідком впливу екстремального холоду, що збільшує ризик холодових травм і смерті у людей. King K. та ін. [47] припустили, що особи похилого віку будуть мати гіршу аутофагічну активність у клітинах ПК, оскільки з віком аутофагія пригнічується. Проте не було жодних вікових відмінностей в аутофагічній активності в мононуклеарах ПК молодих осіб та осіб похилого віку при гіпотермії. При посиленні холодового стресу відбувається ініціація аутофагічних реакцій з накопиченням p62, що передбачає дисфункцію аутофагії зі зрушенням у бік апоптотичних реакцій [47]. Хронічний вплив холоду викликає нейронний окислювальний стрес, запальні ушкодження та аутофагію [48]. При інтенсивному фізичному навантаженні спостерігається підвищення експресії генів аутофагії (*BNIP3*, *BECN1*, *MAP1LC3B*, *ATG5*, *ATG7*, *ATG12*, *ATG16L1* і *SQSTM1*) у лейкоцитах ПК, що може свідчити про участь у регуляції активності лейкоцитів під час інтенсивних вправ [49]. Гіпоксичні вправи значно пригнічували аутофагію за рахунок зниження експресії beclin-1, Atg-1, LC3-II, Atg-12 та LAMP-2 і одночасно посилювали апоптоз CD4<sup>+</sup> Т-лімфоцитів, однак через п'ять тижнів інтенсивних тренувань розвивалася адаптивна відповідь, що характеризувалася підвищенням експресії beclin-1, тим самим сприяючи аутофагії, і пригніченням апоптозу [50]. Дослідження аутофагії у мононуклеарах ПК молодих чоловіків показало збільшення рівнів LC3-II, beclin-2, ULK1 зі зниженням p62, що супроводжувалося підвищенням рівнів TNF- $\alpha$  й розщепленої каспази-3 при зміні інтенсивності фізичного навантаження. А при виконанні фізичних вправ при високій температурі навколишнього середовища, спостерігалось велике накопичення LC3-II і розщепленої каспази-3, однак рівні beclin-2 знижувалися [51]. Натомість стимуляція аутофагії в моно-

viability even when apoptosis is inhibited, which may impair monocyte-mediated immune response [43], [44]. In mustard gas victims, LC3 mRNA levels were elevated in lung cells, but LC3B protein and the LC3II/LC3I ratio were decreased [45]. Diesel exhaust gases affect the viability of bronchial epithelial cells by enhancing apoptosis and necrosis, increasing autophagic flux, and inducing IL-18 production [46].

When in a combat zone, hypothermia, frostbite in winter or heatstroke and sunstroke in summer are possible, as well as a change in the body's tolerance to excessive physical activity during exposure to low or high temperatures. Hypothermia is a critical consequence of extreme cold, which increases the risk of cold-related injuries and death in humans. King K. et al. [47] suggested that older adults would have worse autophagic activity in PB cells, since autophagy is inhibited with age. However, there were no age-related differences in autophagic activity in PB mononuclear cells from young and older individuals under hypothermia. With increasing cold stress, autophagic reactions are initiated with the accumulation of p62, which suggests autophagy dysfunction with a shift toward apoptotic reactions [47]. Chronic exposure to cold causes neuronal oxidative stress, inflammatory damage and autophagy [48]. During intense physical exercise, an increase in the expression of autophagy genes (*BNIP3*, *BECN1*, *MAP1LC3B*, *ATG5*, *ATG7*, *ATG12*, *ATG16L1* and *SQSTM1*) in PB leukocytes is observed, which may indicate involvement in the regulation of leukocyte activity during intense exercise [49]. Hypoxic exercise significantly suppressed autophagy by reducing the expression of beclin-1, Atg-1, LC3-II, Atg-12 and LAMP-2 and simultaneously increased the apoptosis of CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes, but after five weeks of intense training, an adaptive response developed, which was characterized by an increase in beclin-1 expression, thereby promoting autophagy and inhibiting apoptosis [50]. A study of autophagy in PB mononuclear cells from young men showed an increase in the levels of LC3-II, beclin-2, ULK1 with a decrease in p62, which was accompanied by an increase in the levels of TNF- $\alpha$  and cleaved caspase-3 with a change in the intensity of physical exercise. And when performing physical exercise at a high ambient temperature, a large accumulation of LC3-II and cleaved caspase-3 was observed, but the levels of beclin-2 decreased [51].



нуклеарах ПК осіб похилого віку відбувалася лише під час фізичних вправ високої інтенсивності, а при виконанні вправ в умовах високої температури навколишнього середовища, реакція LC3-II слабшала і накопичувався p62, що може свідчити про підвищену клітинну вразливість до теплового стресу, спричиненого фізичним навантаженням [52]. Військові тренування, що супроводжувалися дефіцитом енергії, призвели до активації ULK1 і збільшення співвідношення LC3B-II/I, що передбачає підвищене утворення аутофагосом і активацію аутофагії. Хоча жодних змін у рівнях білка beclin-1 виявлено не було, це може вказувати на те, що регуляція аутофагії не залежить від рівнів beclin-1, але може залежати від його здатності зв'язуватися з VPS34 [53].

Надмірні фізичні навантаження можуть спричиняти серйозні пошкодження м'язової тканини з наступним викидом клітинних компонентів (електролітів, білків) у кровотік, тобто рабдоміолізом, що призводить до гострої ниркової недостатності, серцевої аритмії та смерті [54]. Дані за 2019 рік показали, що серед військовослужбовців США частота рабдоміолізу становить 38,9 на 100 000 осіб у рік [55]. У дослідженні [54] 226 білків сечі, пов'язаних з імунною системою, клітинною адгезією та окислювально-відновлювальним гомеостазом, значно змінилися під час рабдоміолізу, проливаючи світло на патогенез захворювання. Аутофагія, як механізм, залучений до підтримки окислювально-відновлювального гомеостазу, може бути корисним предметом дослідження механізмів рабдоміолізу.

Травми, отримані військовослужбовцями, також можуть впливати на показники аутофагії. При нелетальному травматичному ушкодженні міокарда спостерігалось зниження аутофагії, що може сприяти мітохондріальній дисфункції і пошкодженню серця [56]. Черепно-мозкова травма (ЧМТ) у військовослужбовців є характерною травмою, що пов'язана з виникненням довгострокових поведінкових і когнітивних проблем [57]. Дослідження нейронів пацієнтів з хронічною травматичною енцефалопатією показало підвищену кількість p62-позитивних нейронів на всіх патологічних стадіях, що, ймовірно вказує на наявність проблем з очищенням від клітинного дебрису через порушення аутофагії, подібних до тих, що спостерігаються при хворобі Альцгеймера [57]. Периваскулярні простори в гіпокампі мишей, що зазнали впливу вибухової хвилі, часто містили тільця включень, гранули ліпofусцину, мієлін та аутофагічні вакуолі [58]. Підтвердження активації аутофагії у тканинах лобної ділянки мишей

However, stimulation of autophagy in PB mononuclear cells from elderly people occurred only during high-intensity physical exercise, and when performing exercise at a high ambient temperature, the LC3-II response weakened and p62 accumulated, which may indicate an increased cellular vulnerability to exercise-induced heat stress [52]. Military training, which was accompanied by an energy deficit, led to the activation of ULK1 and an increase in the LC3B-II/I ratio, which suggests an increased formation of autophagosomes and activation of autophagy. Although no changes in beclin-1 protein levels were detected, this may indicate that autophagy regulation is not dependent on beclin-1 levels but may depend on its ability to bind to VPS34 [53].

Excessive physical activity can cause severe damage to muscle tissue followed by the release of cellular components (electrolytes, proteins) into the bloodstream, i.e. rhabdomyolysis, which leads to acute renal failure, cardiac arrhythmia and death [54]. Data from 2019 showed that among US military personnel, the incidence of rhabdomyolysis is 38.9 per 100,000 people per year [55]. In a study [54], 226 urinary proteins associated with the immune system, cell adhesion and redox homeostasis were significantly altered during rhabdomyolysis, shedding light on the pathogenesis of the disease. Autophagy, as a mechanism involved in maintaining redox homeostasis, may be a useful subject for investigating the mechanisms of rhabdomyolysis.

Trauma in the servicemen may also affect autophagy parameters. Decreased autophagy has been observed in non-lethal traumatic myocardial injury, which may contribute to mitochondrial dysfunction and cardiac injury [56]. Traumatic brain injury (TBI) is a common injury in servicemen that is associated with long-term behavioral and cognitive problems [57]. A study of neurons from patients with chronic traumatic encephalopathy showed increased numbers of p62-positive neurons at all pathological stages, likely indicating problems with cellular debris clearance due to autophagy impairments similar to Alzheimer's disease [57]. Perivascular spaces in the hippocampus of blast-exposed mice frequently contained inclusion bodies, lipofuscin granules, myelin, and autophagic vacuoles [58]. Confirmation of autophagy activation in the frontal lobe tissues of mice after blast-induced TBI was demonstrated in an experiment by Zhou Y. et al. [59].

після ЧМТ, спричиненої вибухом, було показано в експерименті Zhou Y. зі співавт. [59]. При повторних легких закритих ЧМТ у гіпокампі мишей також спостерігалися зміни в активності аутофагії [60]. Мононуклеари ПК осіб з великим депресивним розладом характеризувалися підвищеними рівнями p62 і LC3B, що залежали від С-реактивного білка, а тяжкість симптомів розладу була пов'язана зі змінами білків, залучених у мітохондріальну динаміку й мітофагію та запалення [61]. Дослідження синдрому війни у Перській затоці, також відомого як хронічне мульти-симптомне захворювання, демонструють, що мітохондріальні порушення можуть призводити до симптомів цього захворювання, а агенти, що покращують функціонування мітохондрій, мають потенціал для відновлення клітинної енергії й лікування [62].

Іонізуюче випромінювання викликає активацію різноманітних сигнальних шляхів у клітині. Організм людини може зазнати дії іонізуючого випромінювання як внаслідок радіаційних аварій, так і при застосуванні ядерної зброї під час війни, тому було проведено дослідження показників аутофагії в осіб, які постраждали внаслідок Чорнобильської катастрофи. В учасників ЛНА на ЧАЕС також були відсутні зміни показників спонтанного рівня білка LC3B у лімфоцитах і гранулоцитах ПК, проте як і у військовослужбовців Сил оборони України, молодше 50 років, інтенсивність накопичення LC3B у лімфоцитах після інкубації з хлорохіном була нижча, зокрема у тих осіб, які були опромінені у дозах, нижче за 100 мЗв. Незважаючи на те, що зміни рівнів LC3B у лімфоцитах ПК після інкубації з хлорохіном були зафіксовані лише в учасників ЛНА на ЧАЕС з дозою опромінення, нижче 100 мЗв, а змін спонтанного рівня LC3B не було виявлено, проте в учасників ЛНА на ЧАЕС, які були опромінені у більш високих дозах, спостерігалось зниження ААФ. Як і у цивільних осіб, старше 50 років, в учасників ЛНА на ЧАЕС, які були опромінені у дозах більше 100 мЗв, показник спонтанного рівня білка LC3B у моноцитах ПК був нижчим. Знижені показники LC3B у моноцитах ПК після інкубації з хлорохіном зберігалися в даних дозових групах, порівняно з більш молодшими цивільними особами. При цьому в учасників ЛНА на ЧАЕС, які були опромінені у дозах, нижче за 100 мЗв, даний показник був знижений, порівняно з військовослужбовцями, старше 50 років. Показник ААФ моноцитів також знижувався, але був вищим, ніж у цивільних осіб, старше 50 років, водночас показник ААФ гранулоцитів був нижчим, ніж у цивільних осіб обох вікових груп. В учасників ЛНА на ЧАЕС, зокре-

Changes in autophagy activity were also observed in the hippocampus of mice after repeated mild closed TBI [60]. The PB mononuclear cells from individuals with major depressive disorder were characterized by elevated levels of p62 and LC3B, which were dependent on C-reactive protein, and the severity of symptoms of the disorder was associated with changes in proteins involved in mitochondrial dynamics, mitophagy and inflammation [61]. Studies of Gulf War syndrome, also known as a chronic multi-symptom disorder, demonstrate that mitochondrial disorders can lead to the symptoms of this disease, and agents that improve mitochondrial function have the potential to restore cellular energy and treatment [62].

Ionizing radiation activates various signaling pathways in the cell. The human body can be exposed to ionizing radiation both as a result of radiation accidents and the use of nuclear weapons during the war, so a study was conducted on autophagy indices in individuals affected by the Chernobyl accident. The clean-up workers of the Chernobyl accident also showed no changes in spontaneous levels of LC3B protein in PB lymphocytes and granulocytes, but as in the servicemen of the Defense Forces of Ukraine under 50 years of age, the intensity of LC3B protein accumulation in lymphocytes after incubation with chloroquine was lower, in particular in individuals who were irradiated at doses below 100 mSv. Even though changes in levels of LC3B protein in PB lymphocytes after incubation with chloroquine were recorded only in the clean-up workers with a radiation dose below 100 mSv and no changes in the spontaneous level of LC3B protein were detected, a decrease in AAF was observed in the clean-up workers who were irradiated with higher doses. As in civilians over 50 years old, the spontaneous level of LC3B protein in PB monocytes was lower in the clean-up workers irradiated with doses above 100 mSv. Reduced levels of LC3B protein in PB monocytes after incubation with chloroquine persisted in these dose groups compared to younger civilians. At the same time, this indicator was reduced in the clean-up workers irradiated with doses below 100 mSv compared to servicemen over 50 years old. The AAF of monocytes also decreased, but was higher than in civilians over 50 years old, while the AAF of granulocytes was lower than in civilians of both age groups. In the clean-up workers, in particular, in those who were irradi-

ма у тих, хто був опромінений у дозах нижче 100 мЗв, експресія *MTOR*, *RB1CC1* і *SQSTM1* була нижчою, ніж у цивільних осіб, молодше 50 років, а *ULK1* зниженою порівняно з військовослужбовцями, старше 50 років. Експресія *BECN1* була нижчою, ніж у військовослужбовців обох вікових груп. Порівняно з військовослужбовцями, старше 50 років, в учасників ЛНА на ЧАЕС експресія *PIK3C3* знижувалася. В учасників ЛНА на ЧАЕС, які були опромінені у дозах вище 100 мЗв, експресія гена *MAP1LC3B* була найнижчою, порівняно з військовослужбовцями і цивільними особами, старше 50 років. Хоча психічне й фізичне навантаження внаслідок війни могли б підвищити активність аутофагії у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС, як було визначено у військовослужбовців того ж віку, додатковий фактор у вигляді опромінення, ймовірно чинить пригнічуючий ефект. Більш інтенсивне зниження рівнів експресії генів аутофагії у лейкоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС, порівняно з цивільними особами і військовослужбовцями того ж віку, може вказувати на ймовірність існування віддаленого ефекту іонізуючого випромінювання на транскрипцію РНК генів, що кодують білки аутофагічного апарату. Ці зміни можуть зберігатися й передаватися на рівні білка, що позначається на активності аутофагії. Оскільки зміни були виражені у різних дозових групах учасників ЛНА на ЧАЕС, а кореляції з дозою опромінення не було виявлено, отримані результати можуть бути вторинним наслідком порушень процесів, що були модульовані іонізуючим випромінюванням, можливо дозозалежним чином.

Показано, що в опромінених зрілих мегакаріюцитах і макрофагах мишей відбувається негайна активація аутофагії і спостерігається підвищення аутофагічного кліренсу мітохондрій та зниження загибелі клітин [63, 64]. Аутофагія блокувала інгібування проліферації, апоптозу та пошкодження ДНК гемопоетичних клітин при опроміненні. Навпаки, дефектна аутофагія призвела до погіршення кліренсу АФК, а також елімінації пошкоджень ДНК за рахунок скорочення великого набору регуляторних білків, критично важливих для шляхів репарації ДНК [65]. Тобто, аутофагія є критично важливою для підтримки стовбуровості мезенхімальних і гемопоетичних стовбурових клітин після дії іонізуючого випромінювання, зокрема за рахунок зниження кількості АФК й усунення пошкодження ДНК [66, 67]. Делеція *beclin-1* у клітинах людини не блокувала реакцію аутофагії, однак послабила експресію білків репарації дволанцюгових розривів ДНК та утворення комплексів репарації, а також знизила здатність

ated with doses below 100 mSv, the expression levels of *MTOR*, *RB1CC1* and *SQSTM1* were lower than in civilians under 50 years old, and *ULK1* was reduced compared to servicemen over 50 years old. The expression of *BECN1* was lower than in servicemen of both ages. Compared with servicemen over 50 years old, the expression of *PIK3C3* was reduced in the clean-up workers. In the clean-up workers irradiated with doses above 100 mSv, the expression of *MAP1LC3B* was the lowest compared to servicemen and civilians over 50 years old. Although mental and physical stress as a result of war could increase autophagy activity in PB leukocytes of the clean-up workers, as determined by servicemen of the same age, the additional factor of radiation exposure probably has a suppressive effect. A more intense decrease in the expression levels of autophagy genes in PB leukocytes of the clean-up workers compared to civilians and servicemen of the same age may indicate the possibility of a remote effect of ionizing radiation on RNA transcription of genes encoding proteins of the autophagic apparatus. These changes may persist and be transmitted at the protein level, which is reflected in autophagy activity. Since the changes were expressed in the different dose groups of clean-up workers, and no correlation with radiation dose was found, the obtained results may be a secondary consequence of disturbances of processes modulated by ionizing radiation, possibly in a dose-dependent manner.

In irradiated mature mouse megakaryocytes and macrophages, autophagy was shown to be immediately activated, with increased autophagic clearance of mitochondria and decreased cell death [63], [64]. Autophagy blocked the inhibition of proliferation, apoptosis, and DNA damage in hematopoietic cells upon irradiation. In contrast, defective autophagy resulted in impaired ROS clearance and DNA damage clearance by reducing a large set of regulatory proteins critical for DNA repair pathways [65]. Thus, autophagy is critical for maintaining mesenchymal and hematopoietic stem cell stemness following ionizing radiation, in particular by reducing ROS and eliminating DNA damage [66], [67]. Deletion of *beclin-1* in human cells did not block the autophagy response, but weakened the expression of DNA double-strand break repair proteins and the formation of repair complexes, and reduced the ability to repair DNA in cells exposed to ionizing radiation. At the same



до репарації ДНК у клітинах, що зазнали впливу іонізуючого випромінювання. Натомість гіперекспресія beclin-1 разом з делецією Atg7 сприяла репарації пошкоджень ДНК, проте функціональність аутофагії не відновилася [68]. Фібробласти при остео-радіонекрозі щелепи характеризувалися вищими рівнями LC3-II та ATG7, що сприяло стійкості клітин до радіаційно-індукованого апоптозу, а пригнічення ATG7 активувало шлях Akt/mTOR і апоптоз [69]. Делеція Atg7 збільшила тяжкість радіаційно-індукованого ушкодження шкіри, особливо тяжкість фіброзних змін, а активація шляху Akt-mTOR сприяла патогенезу цього процесу, що вказує на важливість Atg7 при опроміненні [70]. Незважаючи на індукування білків, пов'язаних з аутофагією (ATF4, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , beclin-1), накопичення аутофагосом, позитивних за LC3A, LC3B і p62, спостерігалось пригнічення аутофаголізосомального потоку в ендотеліальних клітинах після опромінення [71].

Отже, виявлені в результаті досліджень зміни можуть вказувати на порушення аутофагії у клітинній ланці імунної системи імунокомпromетованих осіб, що може призвести до прискореного клітинного старіння, набуття клітинами SASP та розвитку слабковираженого запалення. Факторами ризику можуть бути надмірне фізичне та психологічне навантаження, несприятливі чинники навколишнього середовища, загострення наявних соматичних захворювань і додаткове інфекційне навантаження разом зі збереженням хронічного запалення, а також вплив іонізуючого випромінювання.

Обмеженнями нашого дослідження є визначення рівнів білка LC3B лише в загальній популяції лімфоцитів ПК без виокремлення основних субпопуляцій лімфоцитів. Також експресія генів аутофагії визначалася лише в загальній фракції лейкоцитів і для обмеженої кількості пацієнтів. Отримані результати відмінності показників експресії генів-регуляторів аутофагії у лейкоцитах ПК між особами груп дослідження вказують на необхідність збільшення кількості даних для їх підтвердження або спростування. У подальших дослідженнях будуть враховані клінічні дані пацієнтів, а також маркери запалення, такі як NF- $\kappa$ B й цитокіни.

Отримані результати демонструють необхідність подальшого дослідження ролі аутофагії, не тільки як гомеостатичного клітинного механізму, але й як процесу, залученого в регуляцію функціонування імунної системи у груп населення, що зазнають надмірної багатфакторної дії стресорних чинників, таких як військовослужбовці, учасники ЛНА на ЧАЕС,

time, overexpression of beclin-1 together with deletion of Atg7 promoted DNA damage repair, but autophagy functionality was not restored [68]. Fibroblasts in osteoradionecrosis of the jaw were characterized by higher levels of LC3-II and ATG7, which contributed to the resistance of cells to radiation-induced apoptosis, and inhibition of ATG7 activated the Akt/mTOR pathway and apoptosis [69]. Atg7 deletion increased the severity of radiation-induced skin injury, especially the severity of fibrotic changes, and activation of the Akt-mTOR pathway contributed to the pathogenesis of this process, indicating the importance of Atg7 in irradiation [70]. Despite the induction of autophagy-related proteins (ATF4, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , beclin-1), accumulation of LC3A, LC3B and p62 positive autophagosomes, inhibition of autophagy-lysosomal flux in endothelial cells was observed [71].

Therefore, the changes revealed as a result of the studies may indicate a violation of autophagy in the cellular compartment of the immune system of immunocompromised individuals, which may lead to accelerated cellular aging, acquisition of SASP by cells and the development of inflammaging. Risk factors may include excessive physical and psychological stress, unfavorable environmental factors, exacerbation of existing somatic diseases and additional infectious load along with the persistence of chronic inflammation, as well as the effect of ionizing radiation.

The limitations of our study are the determination of the level of LC3B protein only in the total population of PB lymphocytes without distinguishing the main lymphocyte subpopulations. Also, the expression of autophagy genes was determined only in the total fraction of leukocytes and for a limited number of patients. The obtained results of the difference in the expression of autophagy regulatory genes in PB leukocytes between individuals in the study groups indicate the need to increase the amount of data to confirm or refute them. Further studies will take into account the clinical data of patients, as well as inflammatory markers such as NF- $\kappa$ B and cytokines.

The obtained results demonstrate the need for further research into the role of autophagy, not only as a homeostatic cellular mechanism, but also as a process involved in the regulation of the immune system in population groups experiencing excessive multifactorial stress, such as the servicemen, the clean-up workers of the Chernobyl accident, and



особи, що постраждали внаслідок воєнних дій, для зменшення ризиків активації інфламейджингу і розвитку поліморбідної патології у майбутньому.

## ВИСНОВКИ

1. У військовослужбовців Сил оборони України обох вікових груп показники спонтанного рівня білка LC3B у лімфоцитах і гранулоцитах ПК були подібними до показників цивільних осіб відповідного віку, проте показник ААФ гранулоцитів знижувався, особливо в осіб старшого віку. Крім того, спільною рисою було зниження експресії гена *SQSTM1*.

2. Зниження хлорохін-індукованого накопичення білка LC3B у лімфоцитах і гранулоцитах ПК виявлено у військовослужбовців Сил оборони України, молодше 50 років. При цьому показник ААФ у лімфоцитах ПК не зазнав суттєвих змін. Показник рівня білка LC3B у моноцитах ПК після інкубації з хлорохіном був знижений, що позначилося на показнику ААФ. Спостерігалось зниження експресії *MTOR*, *RBICC1* і *MAP1LC3B* на тлі відсутності суттєвих змін в експресії *PRKAA1*. У військовослужбовців Сил оборони України, старше 50 років, показник спонтанного рівня білка LC3B і ААФ у моноцитах ПК й рівень експресії гена *PIK3C3* у лейкоцитах ПК був підвищений, порівняно з цивільними особами того ж віку. Експресія генів *ULK1* і *MAP1LC3B* була вищою, ніж у військовослужбовців, молодше 50 років.

3. В учасників ЛНА на ЧАЕС також були відсутні зміни показників спонтанного рівня білка LC3B у лімфоцитах і гранулоцитах ПК. Проте в учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозах вище 100 мЗв, спостерігалось зниження показника ААФ у лімфоцитах ПК. Зниження показника LC3B у моноцитах ПК після інкубації з хлорохіном спостерігалось в осіб, опромінених у дозах вище 100 мЗв, порівняно з більш молодшими цивільними особами. Показник ААФ моноцитів був вищим, ніж у цивільних осіб, старше 50 років, а показник ААФ гранулоцитів ПК був нижчим, ніж у цивільних осіб обох вікових груп. Показники експресії гена *BECN1* і *PIK3C3* були нижчими, ніж у військовослужбовців Сил оборони України. В учасників ЛНА на ЧАЕС з дозою опромінення нижче 100 мЗв, експресія генів *MTOR*, *ULK1*, *RBICC1* і *SQSTM1* була зниженою. Натомість в осіб, що були опромінені у дозах вище 100 мЗв, експресія гена *MAP1LC3B* була нижчою.

4. Виявлено зниження хлорохін-індукованого накопичення LC3B у лімфоцитах ПК в учасників ЛНА

individuals affected by military action, to reduce the risks of inflammaging activation and the development of polymorbid pathology in the future.

## CONCLUSIONS

1. In the servicemen of the Defense Forces of Ukraine of both age groups, the spontaneous level of LC3B protein in PB lymphocytes and granulocytes was similar to those in civilians of the corresponding age, but the AAF of granulocytes decreased, especially in older individuals. In addition, a common feature was a decrease in the expression of *SQSTM1*.

2. A decrease in chloroquine-induced accumulation of LC3B protein in PB lymphocytes and granulocytes was detected in servicemen of the Defense Forces of Ukraine under 50 years of age. At the same time, the AAF in PB lymphocytes did not undergo significant changes. The level of LC3B protein in PB monocytes after incubation with chloroquine was reduced, which affected the AAF. A decrease in the expression of *MTOR*, *RBICC1* and *MAP1LC3B* was observed against the background of the absence of significant changes in the expression of *PRKAA1*. In the servicemen of the Defense Forces of Ukraine over 50 years old, the spontaneous level of LC3B protein and AAF in PB monocytes and the level of *PIK3C3* expression in PB leukocytes were increased compared to civilians of the same age. The level of *ULK1* and *MAP1LC3B* expression was higher than in the servicemen of the Defense Forces of Ukraine under 50 years old.

3. The clean-up workers of the Chernobyl accident also showed no changes in the spontaneous levels of LC3B protein in the PB lymphocytes and granulocytes. However, the clean-up workers irradiated with doses above 100 mSv had a decrease in the AAF in the PB lymphocytes. A decrease in the parameter of LC3B in PB monocytes after incubation with chloroquine was observed in individuals irradiated with doses above 100 mSv compared to younger civilians. The AAF of PB monocytes was higher than in civilians over 50 years old, and the AAF of PB granulocytes was lower than in civilians of both ages. The *BECN1* and *PIK3C3* expression indices were lower than in the servicemen of the Defense Forces of Ukraine. In the clean-up workers with a radiation dose below 100 mSv, the expression of *MTOR*, *ULK1*, *RBICC1* and *SQSTM1* was reduced. At the same time, in individuals irradiated at doses above 100 mSv, the expression of *MAP1LC3B* was lower.

4. A decrease in chloroquine-induced LC3B accumulation in PB lymphocytes was revealed in the

на ЧАЕС, опромінених у дозах, нижче за 100 мЗв, як і у військовослужбовців Сил оборони України, молодше 50 років. При цьому показник LC3B у моноцитах ПК після інкубації з хлорохіном був знижений, порівняно з військовослужбовцями, старше 50 років. Подібно до цивільних осіб, старше 50 років, в учасників ЛНА на ЧАЕС, які були опромінені у дозах більше 100 мЗв, показник спонтанного рівня білка LC3B у моноцитах ПК був нижчим.

5. Показники спонтанного рівня білка LC3B, його накопичення після інкубування з хлорохіном, й ААФ у гранулоцитах і лімфоцитах ПК цивільних осіб, старше 50 років були подібними до показників більш молодших осіб. Проте рівні білка LC3B у моноцитах ПК цивільних осіб, старше 50 років, були нижчими, що позначилося на показнику ААФ і може бути пояснено віковою залежністю продукції білка LC3B.

6. Отримані результати в імуноскомпрометованих осіб можуть вказувати на порушення процесу аутофагії як на транскрипційному, так і на посттрансляційному рівнях, впливаючи на активацію, збірку аутофагосом, селективність, злиття з лізосомами й ефективність деградації клітинного сміття. Визначені зміни показників аутофагії можуть бути пов'язані на клітинному рівні як з віковими змінами самих лейкоцитів та їх функціонування, так і з наслідками міжклітинної взаємодії зі старіючими або пошкодженими соматичними клітинами, що набувають фенотипу SASP. Стресорні чинники, зокрема іонізуюче випромінювання, викликають гормональні та нейроендокринні зміни, що можуть модулювати процес аутофагії. Довготривала дизрегуляція механізмів аутофагії може підвищити ризик активації хронічного запалення, що переходить в інфламейджинг і зрештою призводить до розвитку поліморбідної соматичної патології.

#### **Інформація про фінансування**

Робота виконана у рамках планової НДР «Молекулярно-генетичні та клітинні маркери інфламейджингу у лейкоцитах периферичної крові осіб, постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС (2022–2024 рр.)». № держреєстрації 0122U001203 за фінансування НАМН України.

#### **Конфлікт інтересів**

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

clean-up workers irradiated at doses below 100 mSv, as well as in the servicemen of the Defense Forces of Ukraine under 50 years of age. At the same time, the parameter of LC3B in PB monocytes after incubation with chloroquine was reduced compared to the servicemen over 50 years of age. Similar to the civilians over 50 years of age, the clean-up workers who were irradiated at doses greater than 100 mSv had lower spontaneous levels of LC3B protein in PB monocytes.

5. The spontaneous levels of LC3B protein, and its accumulation after incubation with chloroquine and the AAF in the PB granulocytes and lymphocytes of the civilians over 50 years old were similar to those of the younger individuals. However, the levels of LC3B protein in the PB monocytes of the civilians over 50 years old were lower, which was reflected in the AAF and can be explained by the age dependence of LC3B protein production.

6. The obtained results in immunocompromised individuals may indicate a disturbance of the autophagy process at both transcriptional and post-translational levels, affecting activation, autophagosome assembly, selectivity, fusion with lysosomes and the efficiency of cellular debris degradation. Certain changes in autophagy parameters may be associated at the cellular level with both age-related changes in the leukocytes themselves and their functioning and as a result of intercellular interactions with aging or damaged somatic cells acquiring the SASP phenotype. Stress factors, in particular ionizing radiation, cause hormonal and neuroendocrine changes that can modulate the autophagy process. Long-term dysregulation of autophagy mechanisms can increase the risk of activation of chronic inflammation, turning into inflammaging and, ultimately, the development of polymorbid somatic pathology.

#### **Sources of financing**

The work was carried out within the research project «Molecular-genetic and cellular markers of inflammaging in peripheral blood leukocytes of persons affected as a result of the accident at the Chernobyl nuclear power plant (2022–2024) «State registration #0122U001203 funded by the NAMS of Ukraine.

#### **Conflict of interest**

The author declares no conflict of interest.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Salminen A., Kaarniranta K., Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging*. 2012. Vol. 4, no. 3. P. 166-175. doi: 10.18632/aging.100444
2. Tabibzadeh S. Cell-centric hypotheses of aging. *Front. Biosci.* 2021. Vol. 26, no. 1. P. 1-49. doi: 10.2741/4888
3. Barnes P. J. Mechanisms of development of multimorbidity in the elderly. *Eur. Respir. J.* 2015. Vol. 45, no. 3. P. 790-806. doi: 10.1183/09031936.00229714
4. The link between inflammaging and degenerative joint diseases / E. Rezu?, A. Cardoneanu, A. Burlui et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, no. 3. P. 614. doi: 10.3390/ijms20030614.
5. Inflammaging: implications in sarcopenia / E. Antuna, C. Cachan-Vega, J. C. Bermejo-Millo et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23, no. 23. P. 15039. doi: 10.3390/ijms232315039.
6. Age and age-related diseases: role of inflammation triggers and cytokines / I. M. Rea, D. S. Gibson, V. McGilligan et al. *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9. P. 685. doi: 10.3389/fimmu.2018.00586.
7. Cuervo A. M., Macian F. Autophagy and the immune function in aging. *Curr. Opin. Immunol.* 2014. Vol. 29. P. 97-104. doi: 10.1016/j.coi.2014.05.006.
8. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\alpha$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction / C.-S. Shi, K. Shenderov, N.-N. Huang et al. *Nat. Immunol.* 2012. Vol. 13, no. 3. P. 255-263. doi: 10.1038/ni.2215.
9. Bharath L. P., Nikolajczyk B. S. Next steps in mechanisms of inflammaging. *Autophagy*. 2020. Vol. 16, no. 12. P. 2285-2286. doi: 10.1080/15548627.2020.1822089.
10. Popat A., Patel A., Warnes G. A Flow Cytometric Study of ER Stress and Autophagy. *Cytometry Part A*. 2018. Vol. 95, no. 6. P. 672-682. doi: 10.1002/cyto.a.23665.
11. Balancing mTOR Signaling and Autophagy in the Treatment of Parkinson's Disease / Z. Zhu, C. Yang, A. Iyaswamy et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, no. 3. P. 720-728. doi: 10.3390/ijms20030728.
12. Li Y., Chen Y. AMPK and Autophagy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019. Vol. 1206. P. 85-108. doi: 10.1007/978-981-15-0602-4\_4.
13. Function and regulation of ULK1: From physiology to pathology / Z. Rong, K. Zheng, J. Chen, X. Jin. *Gene*. 2022. Vol. 840. P. 146772. doi: 10.1016/j.gene.2022.146772.
14. Distinct roles of autophagy-dependent and -independent functions of FIP200 revealed by generation and analysis of a mutant knock-in mouse model / S. Chen, C. Wang, S. Yeo et al. *Genes & Development*. 2016. Vol. 30, no. 7. P. 856-869. doi: 10.1101/gad.276428.115.
15. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis / R. Kang, H. J. Zeh, M. T. Lotze, D. Tang. *Cell Death and Differentiation*. 2011. Vol. 18. P. 571-580. doi: 10.1038/cdd.2010.191.
16. Dikic I., Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. Vol. 19, no. 6. P. 349-364. doi: 10.1038/s41580-018-0003-4.

## REFERENCES

1. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging* (Albany NY). 2012;4(3):166-75. doi: 10.18632/aging.100444.
2. Tabibzadeh S. Cell-centric hypotheses of aging. *Front Biosci. (Landmark Ed)*. 2021;26(1):1-49. doi: 10.2741/4888.
3. Barnes PJ. Mechanisms of development of multimorbidity in the elderly. *Eur Respir J*. 2015;45(3):790-806. doi: 10.1183/09031936.00229714.
4. Rezu E, Cardoneanu A, Burlui A, Luca A, Codreanu C, Tamba BI, et al. The link between inflammaging and degenerative joint diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):614. doi: 10.3390/ijms20030614.
5. Antuna E, Cachan-Vega C, Bermejo-Millo JC, Potes Y, Caballero B, Vega-Naredo I, et al. Inflammaging: Implications in sarcopenia. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23):15039. doi: 10.3390/ijms232315039.
6. Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA. Age and age-related diseases: Role of inflammation triggers and cytokines. *Front Immunol*. 2018;9:586. doi: 10.3389/fimmu.2018.00586.
7. Cuervo AM, Macian F. Autophagy and the immune function in aging. *Curr Opin Immunol*. 2014;29:97-104. doi: 10.1016/j.coi.2014.05.006.
8. Shi C-S, Shenderov K, Huang N-N, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\alpha$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol*. 2012;13(3):255-63. doi: 10.1038/ni.2215.
9. Bharath LP, Nikolajczyk BS. Next steps in mechanisms of inflammaging. *Autophagy*. 2020;16(12):2285-6. doi: 10.1080/15548627.2020.1822089.
10. Popat A, Patel AA, Warnes G. A flow cytometric study of ER stress and autophagy: Flow cytometric study. *Cytometry A*. 2019;95(6):672-82. doi: 10.1002/cyto.a.23665.
11. Zhu Z, Yang C, Iyaswamy A, Krishnamoorthi S, Sreenivasurthy SG, Liu J, et al. Balancing mTOR signaling and autophagy in the treatment of Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):728. doi: 10.3390/ijms20030728.
12. Li Y, Chen Y. AMPK and autophagy. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1206:85-108. doi: 10.1007/978-981-15-0602-4\_4.
13. Rong Z, Zheng K, Chen J, Jin X. Function and regulation of ULK1: From physiology to pathology. *Gene*. 2022;840(146772):146772. doi: 10.1016/j.gene.2022.146772.
14. Chen S, Wang C, Yeo S, Liang C-C, Okamoto T, Sun S, et al. Distinct roles of autophagy-dependent and -independent functions of FIP200 revealed by generation and analysis of a mutant knock-in mouse model. *Genes Dev*. 2016;30(7):856-69. doi: 10.1101/gad.276428.115.
15. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2011;18(4):571-80. doi: 10.1038/cdd.2010.191.
16. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(6):349-64. doi: 10.1038/s41580-018-0003-4.



17. Fraiberg M., Elazar Z. Genetic defects of autophagy linked to disease. *Progr. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2020. Vol. 172. P. 293-323. doi: 10.1016/bs.pmbts.2020.04.001.
18. Nakatogawa H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020. Vol. 21, no. 8. P. 439-458. Doi: 10.1038/s41580-020-0241-0.
19. Kumar A. V., Mills J., Lapierre L. R. Selective Autophagy Receptor p62/SQSTM1, a Pivotal Player in Stress and Aging. *Front. Cell Develop. Biol.* 2022. Vol. 10. P. 793328. doi: 10.3389/fcell.2022.793328.
20. STX17 dynamically regulated by Fis1 induces mitophagy via hierarchical macroautophagic mechanism / H. Xian, Q. Yang, L. Xiao et al. *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, no. 1. P. 2059. doi: 10.1038/s41467-019-10096-1
21. Levine B., Mizushima N., Virgin H. W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* 2011. Vol. 469, no. 7330. P. 323-335. doi: 10.1038/nature09782.
22. Choi A. J. S., Ryter S. W. Autophagy in inflammatory diseases. *Int. J. Cell Biol.* 2011. Vol. 2011. P. 1-11. doi: 10.1155/2011/732798
23. Harris J. Autophagy and cytokines. *Cytokine.* 2011. Vol. 56, no. 2. P. 140-144. doi: 10.1016/j.cyto.2011.08.022
24. NF- $\kappa$ B activation represses tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced autophagy / M. Djavaheri-Mergny, M. Amelotti, J. Mathieu et al. *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, no. 41. P. 30373-30382. doi: 10.1074/jbc.m602097200.
25. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production / T. Saitoh, N. Fujita, M. H. Jang et al. *Nature.* 2008. Vol. 456, no. 7219. P. 264-268. doi: 10.1038/nature07383.
26. Metformin enhances autophagy and normalizes mitochondrial function to alleviate aging-associated inflammation / L. P. Bharath, M. Agrawal, G. McCambridge et al. *Cell Metab.* 2020. Vol. 32, no. 1. P. 44-55.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2020.04.015.
27. Yang Z., Goronzy J. J., Weyand C. M. Autophagy in autoimmune disease. *J. Mol. Med.* 2015. Vol. 93, no. 7. P. 707-717. doi: 10.1007/s00109-015-1297-8.
28. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice / D. E. Harrison, R. Strong, Z. D. Sharp et al. *Nature.* 2009. Vol. 460, no. 7253. P. 392-395. doi: 10.1038/nature08221.
29. Dong X., Chu D., Wang Z. Leukocyte-mediated Delivery of Nanotherapeutics in Inflammatory and Tumor Sites. *Theranostics.* 2017. Vol. 7, no. 3. P. 751-763. doi: 10.7150/thno.18069.
30. Inflammation-associated autophagy-related programmed necrotic death of human neutrophils characterized by organelle fusion events / C. C. Mihalache, S. Yousefi, S. Conus et al. *J. Immunol.* 2011. Vol. 186, no. 11. P. 6532-6542. doi: 10.4049/jimmunol.1004055.
31. M.-Y., Lu J.-H. Autophagy and macrophage functions: inflammatory response and phagocytosis. *Cells.* 2019. Vol. 9, no. 1. P. 70. doi: 10.3390/cells9010070.
32. Metabolic alterations in aging macrophages: ingredients for inflammation? / A. A. van Beek, J. Van den Bossche, P. G. Mastroberardino et al. *Nat. Commun.* 2019;10(1):2059. doi: 10.1038/s41467-019-10096-1.
17. Fraiberg M, Elazar Z. Genetic defects of autophagy linked to disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2020;172:293-323. doi: 10.1016/bs.pmbts.2020.04.001.
18. Nakatogawa H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(8):439-58. doi: 10.1038/s41580-020-0241-0.
19. Kumar AV, Mills J, Lapierre LR. Selective autophagy receptor p62/SQSTM1, a pivotal player in stress and aging. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:793328. doi: 10.3389/fcell.2022.793328.
20. Xian H, Yang Q, Xiao L, Shen H-M, Liou Y-C. STX17 dynamically regulated by Fis1 induces mitophagy via hierarchical macroautophagic mechanism. *Nat Commun.* 2019;10(1):2059. doi: 10.1038/s41467-019-10096-1.
21. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* 2011;469(7330):323-35. doi: 10.1038/nature09782.
22. Choi AJS, Ryter SW. Autophagy in inflammatory diseases. *Int J Cell Biol.* 2011;2011:732798. doi: 10.1155/2011/732798.
23. Harris J. Autophagy and cytokines. *Cytokine.* 2011;56(2):140-4. doi: 10.1016/j.cyto.2011.08.022.
24. Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besancon F, Bauvy C, Souquere S, et al. NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem.* 2006;281(41):30373-82. doi: 10.1074/jbc.M602097200.
25. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang B-G, Satoh T, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature.* 2008;456(7219):264-8. doi: 10.1038/nature07383.
26. Bharath LP, Agrawal M, McCambridge G, Nicholas DA, Hasturk H, Liu J, et al. Metformin enhances autophagy and normalizes mitochondrial function to alleviate aging-associated inflammation. *Cell Metab.* 2020;32(1):44-55.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2020.04.015.
27. Yang Z, Goronzy JJ, Weyand CM. Autophagy in autoimmune disease. *J Mol Med.* 2015;93(7):707-17. doi: 10.1007/s00109-015-1297-8.
28. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature.* 2009;460(7253):392-5. doi: 10.1038/nature08221.
29. Dong X, Chu D, Wang Z. Leukocyte-mediated delivery of nanotherapeutics in inflammatory and tumor sites. *Theranostics.* 2017;7(3):751-63. doi: 10.7150/thno.18069.
30. Mihalache CC, Yousefi S, Conus S, Villiger PM, Schneider EM, Simon H-U. Inflammation-associated autophagy-related programmed necrotic death of human neutrophils characterized by organelle fusion events. *J Immunol.* 2011;186(11):6532-42. doi: 10.4049/jimmunol.1004055.
31. Wu M-Y, Lu J-H. Autophagy and macrophage functions: Inflammatory response and phagocytosis. *Cells.* 2019;9(1):70. doi: 10.3390/cells9010070.
32. van Beek AA, Van den Bossche J, Mastroberardino PG, de Winther MPJ, Leenen PJM. Metabolic alterations in aging macrophages:



- dino et al. *Trends in Immunology*. 2019. Vol. 40, no. 2. P. 113-127. doi: 10.1016/j.it.2018.12.007.
33. Transcriptomic profiles of aging in purified human immune cells / L. M. Reynolds, J. Ding, J. R. Taylor et al. *BMC Genomics*. 2015. Vol. 16, no. 1. P. 333. doi: 10.1186/s12864-015-1522-4.
34. Polyamines control eIF5A hypusination, TFEB translation, and autophagy to reverse B cell senescence / H. Zhang, G. Alsaleh, J. Feltham et al. *Mol. Cell*. 2019. Vol. 76, no. 1. P. 110-125.e9. doi: 10.1016/j.molcel.2019.08.005.
35. A novel method for autophagy detection in primary cells: impaired levels of macroautophagy in immunosenescent T cells / K. Phadwal, J. Alegre-Abarrategui, A. S. Watson et al. *Autophagy*. 2012. Vol. 8, no. 4. P. 677-689. doi: 10.4161/auto.18935
36. Age-associated changes in human CD4<sup>+</sup> T cells point to mitochondrial dysfunction consequent to impaired autophagy / A. Bektas, S. H. Schurman, M. Gonzalez-Freire et al. *Aging*. 2019. Vol. 11, no. 21. P. 9234-9263. doi: 10.18632/aging.102438.
37. T cell receptor-mediated activation is a potent inducer of macroautophagy in human CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T cells but not in CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells / C. R. Arnold, T. Pritz, S. Brunner et al. *Exp. Gerontol*. 2014. Vol. 54. P. 75-83. doi: 10.1016/j.exger.2014.01.018.
38. Activation-induced autophagy is preserved in CD4<sup>+</sup> T-cells in familial longevity / Y. Raz, I. Guerrero-Ros, A. Maier et al. *J. Gerontol. Series A*. 2017. Vol. 72, no. 9. P. 1201-1206. doi: 10.1093/gerona/glx020.
39. Identification of an autophagy defect in smokers' alveolar macrophages / M. M. Monick, L. S. Powers, K. Walters et al. *J. Immunol*. 2010. Vol. 185, no. 9. P. 5425-5435. doi: 10.4049/jimmunol.1001603.
40. Insufficient autophagy promotes bronchial epithelial cell senescence in chronic obstructive pulmonary disease / S. Fujii, H. Hara, J. Araya et al. *Oncotarget*. 2012. Vol. 1, no. 5. P. 630-641. doi: 10.4161/onci.20297.
41. Benzene induces hematotoxicity by promoting deacetylation and autophagy / S. Qian, Y. Han, Y. Shi et al. *J. Cell. Mol. Med*. 2018. Vol. 23, no. 2. P. 1022-1033. doi: 10.1111/jcmm.14003.
42. Cutaneous exposure to lewisite causes acute kidney injury by invoking DNA damage and autophagic response / R. K. Srivastava, A. M. Traylor, C. Li et al. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2018. Vol. 314, no. 6. P. F1166-F1176. doi: 10.1152/ajprenal.00277.2017.
43. So K.-Y., Lee B.-H., Oh S.-H. The critical role of autophagy in cadmium-induced immunosuppression regulated by endoplasmic reticulum stress-mediated calpain activation in RAW264.7 mouse monocytes. *Toxicology*. 2018. Vol. 393. P. 15-25. doi: 10.1016/j.tox.2017.10.016.
44. Inhibition of autophagy alleviates cadmium-induced mouse spleen and human B cells apoptosis / J. Gu, Y. Wang, Y. Liu et al. *Toxicol. Sci*. 2019. Vol. 170, no. 1. P. 109-122. doi: 10.1093/toxsci/kfz089.
45. Delayed effects of sulfur mustard on autophagy suppression in chemically-injured lung tissue / M. Eghtedardoost, T. Ghazanfari, Ingredients for inflammaging? *Trends Immunol*. 2019;40(2):113-27. doi: 10.1016/j.it.2018.12.007.
33. Reynolds LM, Ding J, Taylor JR, Lohman K, Soranzo N, de la Fuente A, et al. Transcriptomic profiles of aging in purified human immune cells. *BMC Genomics*. 2015;16(1):333. doi: 10.1186/s12864-015-1522-4.
34. Zhang H, Alsaleh G, Feltham J, Sun Y, Napolitano G, Riffelmacher T, et al. Polyamines control eIF5A hypusination, TFEB translation, and autophagy to reverse B cell senescence. *Mol Cell*. 2019;76(1):110-25.e9. doi: 10.1016/j.molcel.2019.08.005.
35. Phadwal K, Alegre-Abarrategui J, Watson AS, Pike L, Anbalagan S, Hammond EM, et al. A novel method for autophagy detection in primary cells: impaired levels of macroautophagy in immunosenescent T cells. *Autophagy*. 2012;8(4):677-89. doi: 10.4161/auto.18935.
36. Bektas A, Schurman SH, Gonzalez-Freire M, Dunn CA, Singh AK, Macian F, et al. Age-associated changes in human CD4<sup>+</sup> T cells point to mitochondrial dysfunction consequent to impaired autophagy. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(21):9234-63. doi: 10.18632/aging.102438.
37. Arnold CR, Pritz T, Brunner S, Knabb C, Salvenmoser W, Holzwarth B, et al. T cell receptor-mediated activation is a potent inducer of macroautophagy in human CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T cells but not in CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells. *Exp Gerontol*. 2014;54:75-83. doi: 10.1016/j.exger.2014.01.018.
38. Raz Y, Guerrero-Ros I, Maier A, Slagboom PE, Atzmon G, Barzilai N, et al. Activation-induced autophagy is preserved in CD4<sup>+</sup> T-cells in familial longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017;72(9):1201-6. doi: 10.1093/gerona/glx020.
39. Monick MM, Powers LS, Walters K, Lovan N, Zhang M, Gerke A, et al. Identification of an autophagy defect in smokers' alveolar macrophages. *J Immunol*. 2010;185(9):5425-35. doi: 10.4049/jimmunol.1001603.
40. Fujii S, Hara H, Araya J, Takasaka N, Kojima J, Ito S, et al. Insufficient autophagy promotes bronchial epithelial cell senescence in chronic obstructive pulmonary disease. *Oncotarget*. 2012;1(5):630-41. doi: 10.4161/onci.20297.
41. Qian S, Han Y, Shi Y, Xu W, Zhu Y, Jiang S, et al. Benzene induces hematotoxicity by promoting deacetylation and autophagy. *J Cell Mol Med*. 2019;23(2):1022-33. doi: 10.1111/jcmm.14003.
42. Srivastava RK, Traylor AM, Li C, Feng W, Guo L, Antony VB, et al. Cutaneous exposure to lewisite causes acute kidney injury by invoking DNA damage and autophagic response. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;314(6):F1166-76. doi: 10.1152/ajprenal.00277.2017.
43. So K-Y, Lee B-H, Oh S-H. The critical role of autophagy in cadmium-induced immunosuppression regulated by endoplasmic reticulum stress-mediated calpain activation in RAW264.7 mouse monocytes. *Toxicology*. 2018;393:15-25. doi: 10.1016/j.tox.2017.10.016.
44. Gu J, Wang Y, Liu Y, Shi M, Yin L, Hou Y, et al. Inhibition of autophagy alleviates cadmium-induced mouse spleen and human B cells apoptosis. *Toxicol Sci*. 2019;170(1):109-22. doi: 10.1093/toxsci/kfz089.
45. Eghtedardoost M, Ghazanfari T, Sadeghipour A, Hassan ZM, Ghanei M, Ghavami S. Delayed effects of sulfur mustard on autophagy sup-

- A. Sadeghipour et al. *Int. Immunopharmacol.* 2020. Vol. 80. P. 105896. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105896.
46. Diesel exhaust particles induce autophagy and citrullination in Normal Human Bronchial Epithelial cells / T. Colasanti, S. Fiorito, C. Alessandri et al. *Cell Death & Dis.* 2018. Vol. 9, no. 11. P. 1073. doi: 10.1038/s41419-018-1111-y.
47. Impaired autophagy following ex vivo cooling of simulated hypothermic temperatures in peripheral blood mononuclear cells from young and older adults / K. E. King, J. J. McCormick, M. K. McManus et al. *J. Therm. Biol.* 2024. P. 103831. doi: 10.1016/j.jtherbio.2024.103831.
48. Stress injuries and autophagy in mouse hippocampus after chronic cold exposure / T. T. Qu, J. X. Deng, R. L. Li et al. *Neural Regen. Res.* 2017. Vol. 12, no. 3. P. 440-446. doi: 10.4103/1673-5374.202932.
49. Post-effort changes in autophagy- and inflammation-related gene expression in white blood cells of healthy young men / D. Kostorzewa-Nowak, A. Trzeciak-Ryczek, P. Wityk et al. *Cells.* 2021. Vol. 10, no. 6. P. 1406. doi: 10.3390/cells10061406.
50. Effects of Interval and Continuous Exercise Training on CD4 Lymphocyte Apoptotic and Autophagic Responses to Hypoxic Stress in Sedentary Men / T.-P. Weng, S. C. Huang, Y. F. Chuang et al. *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8, no. 11. P. e80248. doi: 10.1371/journal.pone.0080248.
51. The autophagic response to exercise in peripheral blood mononuclear cells from young men is intensity-dependent and is altered by exposure to environmental heat / J. J. McCormick, M. D. Cote, K. E. King et al. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2022. Vol. 323, no. 4. P. R467-R482. doi: 10.1152/ajpregu.00110.2022.
52. The intensity-dependent effects of exercise and superimposing environmental heat stress on autophagy in peripheral blood mononuclear cells from older men / J. J. McCormick, M. K. McManus, K. E. King et al. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2024. Vol. 326, no. 1. P. R29-R42. doi: 10.1152/ajpregu.00163.2023.
53. Increased autophagy signaling but not proteasome activity in human skeletal muscle after prolonged low-intensity exercise with negative energy balance / M. Moberg, G. Hendo, M. Jakobsson et al. *Physiol. Rep.* 2017. Vol. 5, no. 23. P. e13518. doi: 10.14814/phy2.13518.
54. Urine proteomics as a non-invasive approach to monitor exertional rhabdomyolysis during military training / A. Carneiro, J. Macedo-da-Silva, V. F. Santiago et al. *J. Proteomics.* 2022. Vol. 258. P. 104498. doi: 10.1016/j.jprot.2022.104498.
55. Risk factors and future directions for preventing and diagnosing exertional rhabdomyolysis / A. Carneiro, D. Viana-Gomes, J. Macedo-da-Silva et al. *Neuromuscul. Dis.* 2021. Vol. 31, no. 7. P. 583-595. doi: 10.1016/j.nmd.2021.04.007.
56. Decreased autophagy contributes to myocardial dysfunction in rats subjected to nonlethal mechanical trauma / J. Wang, K. Lu, F. Wang et al. *Int. Immunopharmacol.* 2020;80(105896):105896. doi: 10.1016/j.intimp.2019.105896.
46. Colasanti T, Fiorito S, Alessandri C, Serafino A, Andreola F, Barbati C, et al. Diesel exhaust particles induce autophagy and citrullination in normal human bronchial epithelial cells. *Cell Death Dis.* 2018; 9(11):1073. doi: 10.1038/s41419-018-1111-y.
47. King KE, McCormick JJ, McManus MK, Janetos K-MT, Goulet N, Kenny GP. Impaired autophagy following ex vivo cooling of simulated hypothermic temperatures in peripheral blood mononuclear cells from young and older adults. *J Therm Biol.* 2024; 121(103831):103831. doi: 10.1016/j.jtherbio.2024.103831.
48. Qu T-T, Deng J-X, Li R-L, Cui Z-J, Wang X-Q, Wang L, et al. Stress injuries and autophagy in mouse hippocampus after chronic cold exposure. *Neural Regen Res.* 2017;12(3):440-6. doi: 10.4103/1673-5374.202932.
49. Kostrzewa-Nowak D, Trzeciak-Ryczek A, Wityk P, Cembrowska-Lech D, Nowak R. Post-effort changes in autophagy- and inflammation-related gene expression in white blood cells of healthy young men. *Cells.* 2021;10(6):1406. doi: 10.3390/cells10061406.
50. Weng T-P, Huang S-C, Chuang Y-F, Wang J-S. Effects of interval and continuous exercise training on CD4 lymphocyte apoptotic and autophagic responses to hypoxic stress in sedentary men. *PLoS One.* 2013;8(11):e80248. doi: 10.1371/journal.pone.0080248.
51. McCormick JJ, Cote MD, King KE, McManus MK, Goulet N, Dokladny K, et al. Autophagic response to exercise in peripheral blood mononuclear cells from young men is intensity-dependent and is altered by exposure to environmental heat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2022;323(4):R467-82. doi: 10.1152/ajpregu.00110.2022.
52. McCormick JJ, McManus MK, King KE, Goulet N, Kenny GP. The intensity-dependent effects of exercise and superimposing environmental heat stress on autophagy in peripheral blood mononuclear cells from older men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2024;326(1):R29-42. doi: 10.1152/ajpregu.00163.2023.
53. Moberg M, Hendo G, Jakobsson M, Mattsson CM, Ekblom-Bak E, Flockhart M, et al. Increased autophagy signaling but not proteasome activity in human skeletal muscle after prolonged low-intensity exercise with negative energy balance. *Physiol Rep.* 2017;5(23). doi: 10.14814/phy2.13518.
54. Carneiro A, Macedo-da-Silva J, Santiago VF, de Oliveira GS, Guimaraes T, Mendonca CF, et al. Urine proteomics as a non-invasive approach to monitor exertional rhabdomyolysis during military training. *J Proteomics.* 2022;258(104498):104498. doi: 10.1016/j.jprot.2022.104498.
55. Carneiro A, Viana-Gomes D, Macedo-da-Silva J, Lima GHO, Mitri S, Alves SR, et al. Risk factors and future directions for preventing and diagnosing exertional rhabdomyolysis. *Neuromuscul Disord.* 2021; 31(7):583-95. doi: 10.1016/j.nmd.2021.04.007.
56. Wang J, Lu K, Liang F, Li X, Wang L, Yang C, et al. Decreased autophagy contributes to myocardial dysfunction in rats subjected

- Liang et al. *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, no. 8. P. e71400. doi: 10.1371/journal.pone.0071400.
57. Progression of tau pathology within cholinergic nucleus basalis neurons in chronic traumatic encephalopathy: A chronic effects of neurotrauma consortium study / E. J. Mufson, S. E. Perez, M. Nadeem et al. *Brain Inj*. 2016. Vol. 30, no. 12. P. 1399-1413. doi: 10.1080/02699052.2016.1219058.
58. Chronic traumatic encephalopathy in blast-exposed military veterans and a blast neurotrauma mouse model / L. E. Goldstein, A. M. Fisher, C. A. Tagge et al. *Sci. Transl. Med*. 2012. Vol. 4, no. 134. P. 134ra60. doi: 10.1126/scitranslmed.3003716.
59. Zhou Y., Song Y., Zhu L. Activation of autophagy after blast-induced traumatic brain injury in mice. *NeuroReport*. 2023. Vol. 34, no. 15. P. 756-766. doi: 10.1097/wnr.0000000000001951.
60. Repetitive mild closed head injury alters protein expression and dendritic complexity in a mouse model / J. N. Saykally, W. A. Ratliff, K. L. Keeley et al. *J. Neurotrauma*. 2018. Vol. 35, no. 1. P. 139-148. doi: 10.1089/neu.2017.5070.
61. Dysregulation of mitochondrial dynamics, mitophagy and apoptosis in major depressive disorder: Does inflammation play a role? / G. Scaini, B. L. Mason, A. P. Diaz et al. *Mol. Psychiatry*. 2021. Vol. 27, no. 2. P. 1095-1102. doi: 10.1038/s41380-021-01312-w.
62. Raju R. P., Terry A. V. Dysregulation of cellular energetics in Gulf War Illness. *Toxicology*. 2021. Vol. 461. P. 152894. doi: 10.1016/j.tox.2021.152894 (date of access: 29.08.2024)
63. Apoptosis-resistant megakaryocytes produce large and hyperreactive platelets in response to radiation injury / C.-H. Du, Y. D. Wu, K. Yang et al. *Mil. Med. Res*. 2023. Vol. 10, no. 1. doi: 10.1186/s40779-023-00499-z.
64. Radiation induces EIF2AK3/PERK and ERN1/IRE1 mediated pro-survival autophagy / M. Chaurasia, S. Gupta, A. Das et al. *Autophagy*. 2019. Vol. 15, no. 8. P. 1391-1406. doi: 10.1080/15548627.2019.1582973.
65. Autophagy confers DNA damage repair pathways to protect the hematopoietic system from nuclear radiation injury / W. Lin, N. Yuan, Z. Wang et al. *Sci. Rep*. 2015. Vol. 5, no. 1. P. 12362. doi: 10.1038/srep12362. Erratum in: *Sci. Rep*. 2016. Vol. 20, no.6. P. 30095. doi: 10.1038/srep30095.
66. Autophagy prevents irradiation injury and maintains stemness through decreasing ROS generation in mesenchymal stem cells / J. Hou, Z. P. Han, Y. Y. Jing et al. *Cell Death & Disease*. 2013. Vol. 4, no. 10. P. e844. doi: 10.1038/cddis.2013.338.
67. Low-dose irradiation promotes persistent oxidative stress and decreases self-renewal in hematopoietic stem cells / S. Rodrigues-Moreira, S. G. Moreno, G. Ghinatti et al. *Cell Rep*. 2017. Vol. 20, no. 13. P. 3199-3211. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.013.
68. Xu, F., Fang, Y., Yan, L. et al. Nuclear localization of Beclin 1 promotes radiation-induced DNA damage repair independent of autophagy / F. Xu, Y. Fang, L. Yan et al. *Sci. Rep*. 2017. Vol. 7. P. 45385. doi: 10.1038/srep45385.
- to nonlethal mechanical trauma. *PLoS One*. 2013;8(8): e71400. doi: 10.1371/journal.pone.0071400.
57. Mufson EJ, Perez SE, Nadeem M, Mahady L, Kanaan NM, Abrahamson EE, et al. Progression of tau pathology within cholinergic nucleus basalis neurons in chronic traumatic encephalopathy: A chronic effects of neurotrauma consortium study. *Brain Inj*. 2016;30(12):1399-413. doi: 10.1080/02699052.2016.1219058.
58. Goldstein LE, Fisher AM, Tagge CA, Zhang X-L, Velisek L, Sullivan JA, et al. Chronic traumatic encephalopathy in blast-exposed military veterans and a blast neurotrauma mouse model. *Sci Transl Med*. 2012;4(134):134ra60. doi: 10.1126/scitranslmed.3003716.
59. Zhou Y, Song Y, Zhu L. Activation of autophagy after blast-induced traumatic brain injury in mice. *Neuroreport*. 2023; 34(15):759-66. doi: 10.1097/WNR.0000000000001951.
60. Saykally JN, Ratliff WA, Keeley KL, Pick CG, Mervis RF, Citron BA. Repetitive mild closed head injury alters protein expression and dendritic complexity in a mouse model. *J Neurotrauma*. 2018; 35(1):139-48. doi: 10.1089/neu.2017.5070.
61. Scaini G, Mason BL, Diaz AP, Jha MK, Soares JC, Trivedi MH, et al. Dysregulation of mitochondrial dynamics, mitophagy and apoptosis in major depressive disorder: Does inflammation play a role? *Mol Psychiatry*. 2022;27(2):1095-102. doi: 10.1038/s41380-021-01312-w.
62. Raju RP, Terry AV. Dysregulation of cellular energetics in Gulf War Illness. *Toxicology*. 2021;461(152894):152894. doi: 10.1016/j.tox.2021.152894.
63. Du C-H, Wu Y-D, Yang K, Liao W-N, Ran L, Liu C-N, et al. Apoptosis-resistant megakaryocytes produce large and hyperreactive platelets in response to radiation injury. *Mil Med Res*. 2023;10(1): 66. doi: 10.1186/s40779-023-00499-z.
64. Chaurasia M, Gupta S, Das A, Dwarakanath BS, Simonsen A, Sharma K. Radiation induces EIF2AK3/PERK and ERN1/IRE1 mediated pro-survival autophagy. *Autophagy*. 2019;15(8): 1391-406. doi: 10.1080/15548627.2019.1582973.
65. Lin W, Yuan N, Wang Z, Cao Y, Fang Y, Li X, et al. Autophagy confers DNA damage repair pathways to protect the hematopoietic system from nuclear radiation injury. *Sci Rep*. 2015;5:12362. doi: 10.1038/srep12362 Erratum in: *Sci Rep*. 2016;6:30095. doi: 10.1038/srep30095.
66. Hou J, Han Z-P, Jing Y-Y, Yang X, Zhang S-S, Sun K, et al. Autophagy prevents irradiation injury and maintains stemness through decreasing ROS generation in mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis*. 2013;4(10):e844. doi: 10.1038/cddis.2013.338.
67. Rodrigues-Moreira S, Moreno SG, Ghinatti G, Lewandowski D, Hofschir F, Ferri F, et al. Low-dose irradiation promotes persistent oxidative stress and decreases self-renewal in hematopoietic stem cells. *Cell Rep*. 2017;20(13):3199-211. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.013.
68. Xu F, Fang Y, Yan L, Xu L, Zhang S, Cao Y, et al. Nuclear localization of Beclin 1 promotes radiation-induced DNA damage repair independent of autophagy. *Sci Rep*. 2017;7:45385. doi: 10.1038/srep45385.

69. ATG7-mediated autophagy protects human gingival myofibroblasts from irradiation-induced apoptosis / X. Zhuang, X. Lin, R. Xu et al. *J. Oral Pathol. Med.* 2023. Vol. 52, no. 10. P. 996-1003. doi: 10.1111/jop.13490.
70. Autophagy gene Atg7 regulates the development of radiation-induced skin injury and fibrosis of skin / X. Chen, W. Qin, L. Wang et al. *Skin Res. Technol.* 2023. Vol. 29, no. 6. P. e13337. doi: 10.1111/srt.13337.
71. Kalamida D., Karagounis I.V., Giatromanolaki A., Koukourakis M.I. Important role of autophagy in endothelial cell response to ionizing radiation. *PLoS One.* 2014. Vol. 9, no. 7. P. e102408. doi: 10.1371/journal.pone.0102408.
69. Zhuang X, Lin X, Xu R, Zhang Z, Zhou B, Deng F. ATG7-mediated autophagy protects human gingival myofibroblasts from irradiation-induced apoptosis. *J Oral Pathol Med.* 2023;52(10):996-1003. doi: 10.1111/jop.13490.
70. Chen X, Qin W, Wang L, Jin Y, Tu J, Yuan X. Autophagy gene Atg7 regulates the development of radiation-induced skin injury and fibrosis of skin. *Skin Res Technol.* 2023;29(6):e13337. doi: 10.1111/srt.13337.
71. Kalamida D, Karagounis IV, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. Important role of autophagy in endothelial cell response to ionizing radiation. *PLoS One.* 2014;9(7):e102408. doi: 10.1371/journal.pone.0102408.

### ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

**Зварич Лілія Миколаївна**, молодший науковий співробітник лабораторії імуноцитології відділу клінічної імунології Інституту клінічної радіології, ННЦРМГО, Київ  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1805-1319>

**Бази́ка Димитрій Анатолійович**, доктор медичних наук, академік НАМН України, генеральний директор ННЦРМГО, Київ  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9982-5-5990>

### INFORMATION ABOUT AUTHORS

**Liliia M. Zvarych**, Junior Research Associate, Immunocytology Laboratory of Clinical Immunology Department, Clinical Radiology Institute, NRCRM, Kyiv, Ukraine  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1805-1319>

**Dimitry A. Bazyka**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Immunocytology Laboratory of Clinical Immunology Department, Clinical Radiology Institute, NRCRM, Kyiv, Ukraine  
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9982-5-5990>

Стаття надійшла до редакції 15.10.2024

Received: 15.10.2024